

**Untersuchungen zur
rekombinanten Proteinproduktion
und Tetrapyrrolbiosynthese
in *Bacillus megaterium***

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina

zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer

Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Constanze Franziska Finger

aus Stuttgart

1. Referent: Professor Dr. Dieter Jahn

2. Referentin: Professorin Dr. Gunhild Layer

eingereicht am: 03.08.2015

mündliche Prüfung (Disputation) am: 16.09.2015

Druckjahr 2015

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikation

Finger C., Gamer M., Klunkelfuß S., Bunk B., and Biedendieck R. (2015) Impact of rare codons and the functional coproduction of rate-limiting tRNAs on recombinant protein production in *Bacillus megaterium*. *Appl Microbiol Biotechnol*, in press.

Tagungsbeiträge

Finger C., Gamer M., Bunk B., Knuuti T., and Biedendieck R. (2011) Development of a codon-plus *Bacillus megaterium* strain for recombinant protein production. ProkaGenomics, 5th European Conference on Prokaryotic and Fungal Genomics, Göttingen, Germany. (Poster)

Finger C., Gamer M., Bunk B., Knuuti T., Biedendieck R., and Jahn D. (2012) Influence of codon usage on heterologous protein production in *Bacillus megaterium*. 15th European Congress on Biotechnology, Istanbul, Turkey. (Poster)

Finger C., Keller-Hüschemenger J., Suwandhi L., Buchmeier S., Lukat P., Nicke T., Layer G., Knuuti T., Jahn D., and Biedendieck R. (2013) Interaction studies between HemC and HemD of *Bacillus megaterium* involved in tetrapyrrole biosynthesis. VAAM-Jahrestagung, Bremen, Germany. (Poster)

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	I
1 EINLEITUNG	1
1.1 REKOMBINANTE PROTEINPRODUKTION	1
1.2 ETABLIERUNG VON <i>BACILLUS MEGATERIUM</i> FÜR DIE REKOMBINANTE PROTEINPRODUKTION	1
1.2.1 <i>Bacillus megaterium</i>	1
1.2.2 <i>Grundlage der rekombinanten Proteinproduktion in Bacillus megaterium</i>	3
1.2.3 <i>Verbesserung der Expressionseffizienz in Bacillus megaterium</i>	4
1.2.4 <i>Verbesserung der Translation und der Proteinfaltung in Bacillus megaterium</i>	4
1.2.5 <i>Verbesserung der Sekretionseffizienz und Exo-Proteinstabilität</i>	6
1.2.6 <i>Globales Verständnis der rekombinanten Proteinproduktion in Bacillus megaterium</i>	7
1.3 GENETISCHER CODE UND CODONGEBRAUCH	9
1.3.1 <i>Optimierung und Anpassung von Gensequenzen</i>	11
1.3.2 <i>tRNA-Supplementation von bakterieller Expressionsstämmen</i>	13
1.4 TETRAPYRROLE.....	15
1.4.1 <i>Struktur und Funktion der Tetrapyrrole</i>	15
1.4.2 <i>Tetrapyrrolbiosynthese im Überblick</i>	17
1.4.2.1 <i>Vom Porphobilinogen zum Uroporphyrinogen III im Detail</i>	19
1.4.2.2 <i>Substrat-Channeling während der Tetrapyrrolbiosynthese</i>	25
2 ZIELSETZUNG	28
3 MATERIAL UND METHODEN	29
3.1 GERÄTE UND CHEMIKALIEN	29
3.2 BAKTERIENSTÄMME UND PLASMIDE	31
3.3 KULTURMEDIEN UND MEDIENZUSÄTZE.....	37
3.3.1 <i>Vollmedium für Bacillus megaterium und Escherichia coli</i>	37
3.3.2 <i>Medienzusätze</i>	37
3.4 MIKROBIOLOGISCHE TECHNIKEN	37

3.4.1	<i>Sterilisation</i>	37
3.4.2	<i>Bakterienkultivierung</i>	38
3.4.3	<i>Bestimmung der Zelldichte</i>	38
3.4.4	<i>Lagerung von Bakterien</i>	38
3.5	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	38
3.5.1	<i>Präparation von Plasmid-DNA aus Escherichia coli</i>	39
3.5.2	<i>DNA-Konzentrationsbestimmung</i>	39
3.5.3	<i>Agarose-Gelelektrophorese</i>	40
3.5.4	<i>DNA-Amplifizierung mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)</i>	40
3.5.5	<i>Reinigung von PCR-Amplifikaten</i>	43
3.5.6	<i>Reinigung von DNA-Fragmenten mittels Gelextraktion</i>	43
3.5.7	<i>Restriktionsverdau von DNA</i>	43
3.5.8	<i>Ligation von DNA-Fragmenten</i>	43
3.5.9	<i>DNA-Sequenzierung</i>	44
3.5.10	<i>Herstellung und Transformation von CaCl₂-kompetenten Escherichia coli Zellen</i>	44
3.5.11	<i>Herstellung und Transformation von Bacillus megaterium Protoplasten</i>	45
3.6	REKOMBINANTE PROTEINPRODUKTION UND PROTEINANALYSE	46
3.6.1	<i>Rekombinante Proteinproduktion in Bacillus megaterium</i>	46
3.6.2	<i>Präparation der löslichen, intrazellulären Proteinfraction von Bacillus megaterium</i>	46
3.6.3	<i>Rekombinante Proteinproduktion von His-HemC und His-HemD in Escherichia coli</i>	47
3.6.4	<i>Zellaufschluss mittels Ultraschall</i>	47
3.6.5	<i>Zellaufschluss mittels Kugelmöhlenverfahren</i>	48
3.6.6	<i>Proteinreinigung von His-HemC und His-HemD mittels Affinitätschromatographie</i>	48
3.6.7	<i>Proteinreinigung von His-HemC und His-HemD mittels Gelpermeationschromatographie (GPC)</i>	49
3.6.8	<i>Thermofluor Assay</i>	50
3.6.9	<i>Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford-Assay</i>	51
3.6.10	<i>Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)</i>	51

3.6.11	Western Blot.....	53
3.6.12	Generierung von Antikörpern.....	55
3.6.13	Visualisierung und Quantifizierung der GFP-Fluoreszenz	56
3.6.14	<i>p</i> -Nitrophenylpalmitat-Assay zur Bestimmung der Aktivität der Thermobifida fusca Hydrolase (TFH).....	57
3.6.15	Formiat-Assay zur Bestimmung der Aktivität der Formiatdehydrogenase (FDH).....	57
3.6.16	Bacterial Two-Hybrid (BACTH) Assay	58
3.6.17	Förster-Resonanzenergietransfer (FRET)	58
3.6.18	Floureszenzmikroskopie	59
3.6.19	Co-Kristallisation	59
3.6.20	Co-Immunopräzipitation (Co-IP)	60
3.6.21	Pulldown.....	62
3.6.22	Proteomanalyse	62
3.6.23	Bionformatische Analyse.....	63
4	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	64
4.1	REKOMBINANTE PROTEINPRODUKTION, CODONGEBRAUCH UND <i>tRNA</i> COEXPRESSION IN <i>BACILLUS MEGATERIUM</i>	64
4.1.1	Bioinformatische Identifikation von <i>tRNA</i> -Genen im <i>B. megaterium</i> Genom	65
4.1.2	Untersuchung zur <i>tRNA</i> Coexpression mit dem GFP-Codontestsystem.....	70
4.1.2.1	Klonierung der <i>tRNA</i> -Gene in Vektoren des GFP-Codontestsystems.....	70
4.1.2.2	Einfluss der Position und der Orientierung der <i>tRNA</i> -Gene im Vektor auf die rekombinante GFP Produktion	74
4.1.2.3	Auswirkung der Coexpression verschiedener <i>tRNA</i> -Gene auf die rekombinante GFP Produktion.....	78
4.1.3	Untersuchung der Produktion von rekombinanten Testproteinen bei Coex- pression von <i>tRNA</i> -Genen	83
4.1.3.1	Klonierung der Vektoren für die Coexpression von <i>tfh</i> und <i>fdh</i> mit unterschiedlichen <i>tRNAs</i>	85
4.1.3.2	Auswirkung der <i>tRNA</i> Coexpression auf die Menge an rekombinanter TFH bzw. FDH	87
4.1.3.3	Vergleich des intrazellulären Proteoms zwischen rekombinant FDH produ- zierendem <i>B. megaterium</i> ohne und mit coexprimierten seltenen <i>tRNA</i> -Genen.....	93

4.2	STUDIEN ZUR INTERAKTION ZWISCHEN HEMC UND HEMD AUS <i>BACILLUS</i>	
	<i>MEGATERIUM</i>	96
4.2.1	In vivo <i>Interaktionsstudien</i>	96
4.2.1.1	Bacterial Two-Hybrid (BACTH) Assay in <i>E. coli</i>	97
4.2.1.2	Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) in <i>B. megaterium</i>	100
4.2.2	In vitro <i>Interaktionsstudien</i>	107
4.2.2.1	Rekombinante Produktion von His-HemC und His-HemD aus <i>B. megaterium</i> in <i>E. coli</i>	107
4.2.2.2	Herstellung von Antikörpern gegen HemC und HemD	109
4.2.2.3	His-HemC-His-HemD Co-Kristallisationsversuche	111
4.2.2.4	HemD-HemC Co-Immunopräzipitation	113
4.2.2.5	His-HemC-HemD Pulldownversuche	117
5	ZUSAMMENFASSUNG	120
6	SUMMARY	121
7	AUSBLICK	122
8	LITERATURVERZEICHNIS	123
9	ANHANG	137
	DANKSAGUNG	143

Abkürzungsverzeichnis

APB	Alkalisches Phosphatase Puffer
ALA	5-Aminolävulinsäure
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BACTH	engl. Bacterial Two-Hybrid
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indocylphosphat
bp	Basenpaare
CAI	engl. Codon Adaptation Index
CaM	Calmodulin
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CAP	Katabolit-Aktivatorprotein
Carb	Carbenicillin
CFP	engl. Cyan Fluorescence Protein
Cm	Chloramphenicol
Co-IP	Co-Immunopräzipitation
Da	Dalton
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DPM	Dipyrromethancofaktor
DSS	Disuccinimidylsuberat
DTT	1,4-Dithio-DL-threitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	eng. Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FDH	Formiatdehydrogenase
FMN	Flavinmononukleotid
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
fw	engl. foward
GFP	engl. Green Fluorescence Protein
GPC	Gelpermeationschromatographie
HRP	engl. Horse Radish Peroxidase

IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasenpaar
kDa	Kilodalton
LB	Luria Bertani
MB	engl. Magnetic Beads
Mb	Megabasenpaar
MCS	engl. Multiple Cloning Site
M _r	relative molekulare Masse
nat	nativ
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
OD _{λ}	optische Dichte bei der Wellenlänge λ
opti	codonoptimiert
ORF	engl. Open Reading Frame
<i>ori</i>	engl. origin of replication
PCR	engl. Polymerase Chain Reaction
PGB	Porphobilinogen
PVDF	Polyvinylidenfluoridmembran
RBS	Ribosomenbindestelle
RT	Raumtemperatur
rv	engl. reverse
SAM	S-Adenosyl-L-Methionin
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SV	Säulenvolumen
SP	Signalpeptid
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Tet	Tetracyclin
TFH	Hydrolase aus <i>Thermobifida fusca</i>
U	Unit
üN	über Nacht
v/v	Volume pro Volumen
w/v	Masse pro Volumen
X-Gal	5-Bromo-1-chloro-3-indol- β -D-galactopyranosid
YFP	engl. Yellow Fluorescence Protein

1 Einleitung

1.1 Rekombinante Proteinproduktion

Mit der Entwicklung molekulargenetischer Techniken Anfang der 1970er Jahre wurde es möglich, manipulierte Fremd-DNA in einen Wirtsorganismus einzuschleusen und diese zu exprimieren (Waegeman & Soetaert, 2011). Somit war die Grundlage gelegt, Proteine in einem Organismus zu produzieren, die ursprünglicher Weise nicht in diesem vorkommen.

Als Wirtsorganismus werden zumeist bakterielle Wirte genutzt (Terpe, 2006). Dabei ist der am besten etablierte und gängigste Produktionswirt *Escherichia coli*. Aber auch Pilze, Insekten- und tierische Zellen werden für die rekombinante Proteinproduktion eingesetzt. Neben Kostenüberlegungen, die klar zugunsten der Bakterienzellen ausfallen, spielen Eigenschaften des zu produzierenden Proteins wie beispielsweise die Faltung oder posttranslationale Modifikationen eine wichtige Rolle bei der Wahl des Wirtsorganismus (Makrides, 1996).

Für die Wissenschaft aber auch für die Industrie hat die rekombinante Proteinproduktion weite Perspektiven eröffnet, da es durch diese Technik möglich wurde, große Mengen an reinem Protein zu gewinnen. Heutzutage ist es in der Wissenschaft gängige Praxis, Proteine rekombinant zu produzieren, um ihre Eigenschaften, Funktion und Struktur zu erforschen. Aber auch in der Industrie haben rekombinante Proteine große Bedeutung erlangt. Im Sektor der pharmazeutischen Industrie werden Medikamente, Impfstoffe und Komponenten für diagnostische Tests rekombinant gewonnen. Auch in Bereichen wie z.B. der Waschmittel-, Textil- oder Futtermittelindustrie werden große Mengen rekombinant produzierte Enzyme eingesetzt. Aber die Anwendungen und damit der Bedarf an rekombinanten Proteinen wachsen stetig, was nach verbesserten Strategien und möglichst kostengünstigen Bedingungen für die rekombinante Proteinproduktion verlangt (Palomares *et al.*, 2004). Durch das grundlegende Verständnis der zellulären Mechanismen, denen die Proteinproduktion unterliegt, ist es möglich, nicht nur neue Expressionssysteme zu etablieren bzw. weiterzuentwickeln, sondern auch Produktionsstämme dahingehend zu manipulieren, dass eine noch effizientere rekombinante Proteinproduktion gewährleistet werden kann.

1.2 Etablierung von *Bacillus megaterium* für die rekombinante Proteinproduktion

1.2.1 *Bacillus megaterium*

Das Gram positive stäbchenförmige Bakterium *Bacillus megaterium* wurde vor 130 Jahren zum ersten Mal beschrieben (de Bary, 1884). Aufgrund seiner enormen Zellgröße von 5 µm x 2 µm erhielt es den griechischen Namen „megatherium“, was übersetzt „großes Tier“ bedeutet. Dieser Eindruck wird zusätzlich verstärkt, da *B. megaterium* dazu neigt, Zellketten zu bilden (Abb. 1). Taxonomisch

wird *B. megaterium* dem Phylum Firmicutes und dem Genus der endosporenbildenden Bacilli zugeordnet (Priest *et al.*, 1988). Das *B. megaterium* Genom besitzt ca. 5 Mbp und hat einen durchschnittlichen GC-Gehalt von 38 % (Eppinger *et al.*, 2011). Vielfältige metabolische Fähigkeiten ermöglichen *B. megaterium* die Besiedlung unterschiedlicher Habitate vom Boden und Reisfeldern, über Meerwasser bis hin zu Honig (Vary, 1994). Durch seine enorme Zellgröße und auch die Größe der Sporen eignet sich *B. megaterium* besonders gut für morphologische Untersuchungen der Zellwand, der Cytoplasmamembran, aber auch des Entwicklungsprozesses und dem Aufbau von Sporen (Gally *et al.*, 1991; Foerster & Foster, 1966).

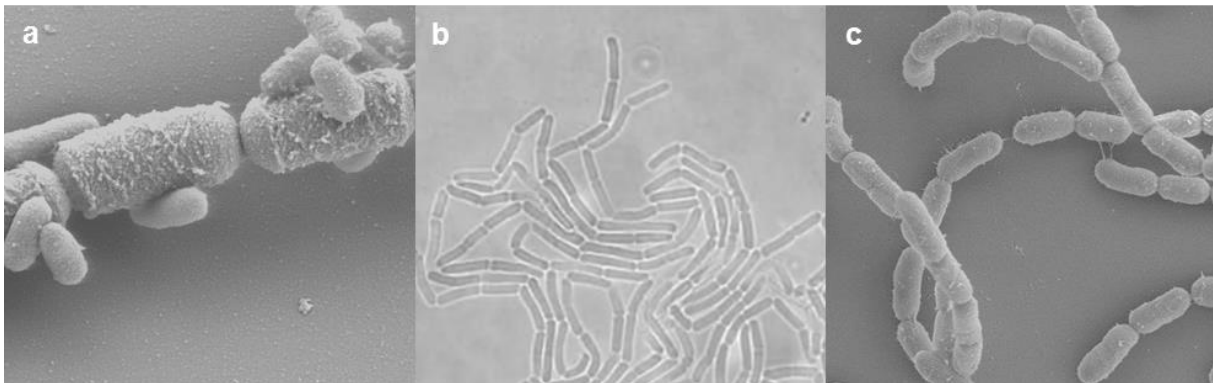


Abb. 1: *Bacillus megaterium*. a: Elektronenmikroskopische Aufnahme von *B. megaterium* Zellen im Vergleich zu kleineren *E. coli* Zellen (Rohde, M., HZI Braunschweig, 2006). b und c: Kettenartige Zusammenlagerung der *B. megaterium* Zellen (b: Lichtmikroskopische Aufnahme, 630x, (Leupold, 2009), c: Elektronenmikroskopische Aufnahme (Rohde, M., HZI Braunschweig, 2006).

Für die industrielle Biotechnologie ist *B. megaterium* seit Jahrzehnten von großem Nutzen, da er natürlicherweise eine Vielzahl an relevanten Exoenzymen produziert (Vary, 1994). Darunter finden sich beispielsweise α - und β -Amylasen (Hebeda, R. E. *et al.*, 1988), die als Backhilfsmittel eingesetzt werden, sowie Penicillinamidasen (Martin *et al.*, 1995), die bei der Modifikation von halbsynthetischen β -Lactam-Antibiotika eine Rolle spielen. Zusätzlich vereint *B. megaterium* einige Eigenschaften, die ihn als alternativen Wirt für rekombinante Proteinproduktion interessant machen. Im Gegensatz zu Gram negativen Organismen wie *E. coli*, besitzt *B. megaterium* keine Membranständigen Endotoxine, was ihn für den Einsatz in der Nahrungsmittelproduktion und auch für pharmazeutische Produktionsprozesse prädestiniert. Die Zellkultivierung ist kostengünstig zu bewerkstelligen, da *B. megaterium* unterschiedliche Kohlenstoffquellen, dabei sogar Abfallstoffe wie Melasse und Glycerin, nutzen kann (Vary *et al.*, 2007). Ein weiterer Vorteil ist, dass *B. megaterium* ein effektives Sekretionssystem für Proteine besitzt (Priest, 1977). Damit ist eine problemlose Sekretion der Zielproteine in den Kulturüberstand möglich, was die darauffolgenden Downstreamprozesse vereinfacht. Alkalische Proteasen, die von anderen *Bacillus*-Arten wie z.B. *Bacillus subtilis* sekretiert werden und zum Abbau von Proteinen beitragen (Li *et al.*, 2004), sind in *B. megaterium* nicht vorhanden, was eine hohe Stabilität von extrazellulären Proteinen gewährleistet.

Bis heute wird die in den 1990er Jahren etablierte Methode der Protoplastentransformation angewandt, um genetisches Material in *B. megaterium* einzubringen (Von Tersch & Robbins, 1990). Für diese gentechnischen Arbeiten wird v.a. der Stamm DSM319 eingesetzt, da dieser im Gegensatz zu anderen *B. megaterium* Stämmen kein eigenes Plasmid trägt und somit Plasmid-Inkompatibilitäten umgangen werden können. Auch rekombinante Plasmide weisen eine hohe Stabilität in *B. megaterium* auf, was ihn gegenüber *B. subtilis* auszeichnet, und ihn für biotechnologische Anwendungen qualifiziert (Biedendieck *et al.*, 2010a).

1.2.2 Grundlage der rekombinanten Proteinproduktion in *Bacillus megaterium*

Mit der Identifikation des Xylose-induzierbaren Promotors bei der Untersuchung des Xylose-Operons in *B. megaterium* DSM319 schafften Rygus und Hillen die Voraussetzung für ein induzierbares Vektorsystem (Rygus *et al.*, 1991). Die Regulation dieses Operons erfolgt durch einen upstream des Operons kodierten Repressor XylR. Bei Abwesenheit von Xylose bindet dieser nahe am Promotor P_{xylA} des Operons und verhindert die Transkription der für die Xyloseverwertung wichtigen Gene. Ist jedoch Xylose verfügbar, bindet diese an den Repressor, der dadurch eine Konformationsänderung durchläuft und sich von der Operatorsequenz löst. Damit ist die Transkription der Gene des Xylose-Operons möglich.

Rygus und Hillen brachten diese regulatorischen Elemente - das Gen *xylR* samt dessen Promotor P_{xylR} und den Promotor P_{xylA} mit dem 5'-Bereich des *xylA*-Gens sowie downstream des *xylA*-Bereichs eine MCS (Multiple Cloning Site) in den *Bacillus cereus* Vektor pBC16 ein (Kreft *et al.*, 1978). Um die Replikation und Selektion und damit eine Klonierung in *E. coli* zu gewährleisten, wurden ebenfalls der Replikationsursprung von pBR322 und das β -Lactamasegen in das Plasmid eingebracht. Für die Replikation und Selektion in *B. megaterium* stehen die Replikationselemente *oriU* und *repU* und das Gen *tet* einer Tetracyclin-Effluxpumpe aus *B. cereus* zur Verfügung. Der so entstandene Vektor pWH1520 ermöglicht eine über Xylose regulierbare Proteinproduktion in *B. megaterium* (Rygus & Hillen, 1991) (Abb. 2). Mit diesem Shuttlevektor konnte die Produktion von intrazellulären pro- und eukaryotischen Proteinen in *B. megaterium* gezeigt werden, wobei die Zugabe von Xylose zu einer bis zu 350-fachen Steigerung der Proteinproduktion verglichen zum uninduzierten Zustand führte (Rygus & Hillen, 1991). Im Folgenden wurde das genutzte Promotorsystem weiterentwickelt, indem die MCS um 15 Restriktionsschnittstellen erweitert wurde. Außerdem wurde das natürliche Katabolit-Repressionselement am 5'-Ende des *xylA*-Gens entfernt, so dass die Genexpression bei Wachstum auf Glucose nicht mehr beeinträchtigt ist (Malten *et al.*, 2005a).

Nicht nur die Produktion der Proteine, sondern auch deren Reinigung ist ein wichtiger Punkt. Daher wurde das bestehende Vektorsystem um die Sequenzen für den His₆- bzw. StrepII- Affinitätstag erweitert, was zu einer Reihe an Vektoren führte, durch die Proteine mit N- oder C-terminal

fusionierten Tags produziert und anschließend über Affinitätschromatographie gereinigt werden können (Biedendieck *et al.*, 2007b) (Abb. 2). Diese Systeme wurden bereits erfolgreich für die Produktion und Reinigung von GFP (green fluoreszenz protein) und anderen Proteinen eingesetzt (Biedendieck *et al.*, 2007b; Stammen *et al.*, 2010a; Moore *et al.*, 2013).

1.2.3 Verbesserung der Expressionseffizienz in *Bacillus megaterium*

Die Expressionsrate eines Gens ist abhängig von der Stärke des Promotors. Dieser besteht aus einer charakteristischen Nukleotidabfolge im -35 (TTGACA) und -10 (TATAAT) Bereich bezogen auf den Transkriptionsstart. Besonders starke Promotoren weisen eine optimale Übereinstimmung mit der Consensussequenz in diesen Basiselementen auf, was zu einer besseren Bindung der DNA abhängigen RNA-Polymerase führt und damit zu einer erhöhten Transkriptionseffizienz (deHaseth *et al.*, 1998). Um die Expressionseffizienz in *B. megaterium* zu erhöhen, wurde daher die -35 und -10 Region des Xylose-induzierbaren Promotors optimiert (Stammen *et al.*, 2010a) (Abb. 2). Anhand der Testproduktion von GFP konnte festgestellt werden, dass sich durch die Optimierung des -35 Bereichs der Proteinertrag um das 10-fache bzw. durch die Optimierung des -10 Bereichs um das 3-fache steigern ließ (Stammen *et al.*, 2010a).

Eine andere Möglichkeit, die Genexpression zu steigern, ist der Einsatz von viralen DNA-abhängigen RNA-Polymerasen, da diese oft eine höhere Geschwindigkeit und eine höhere Prozessivität erreichen als die des bakteriellen Wirtes. Die RNA-Polymerase des Bakteriophagen T7 beispielsweise ist 5 mal schneller als die *E. coli* Polymerase (Sorensen & Mortensen, 2005). Auch für *B. megaterium* wurden verschiedene Vektorsysteme entwickelt, die virale RNA-Polymerasen für die heterologe Genexpression nutzen (Abb. 2). Hierbei werden zwei Plasmide in den Produktionsstamm eingeschleust, wobei das eine das virale RNA-Polymerasegen unter der Kontrolle eines Xylose-induzierbaren Promotors trägt, während das andere das Zielprotein unter der Kontrolle des entsprechenden Phagenpromotors kodiert. Insgesamt wurde drei solcher Systeme entwickelt, die auf unterschiedlichen viralen Polymerasen der Phagen T7, K1E bzw. SP6 basieren und einen bis zu 7-fach höheren GFP-Ertrag erzielten (Gamer *et al.*, 2009; Stammen *et al.*, 2010b). Zudem zeigen sie eine strikte Promotorkontrolle in *E. coli*, was das Klonieren und auch die Expression von toxischen Genen ermöglicht (Biedendieck *et al.*, 2011).

1.2.4 Verbesserung der Translation und der Proteinfaltung in *Bacillus megaterium*

Die Translationseffizienz wird von verschiedenen Faktoren beeinflusst. Besonders wichtig ist dabei die Translationsinitiation, die abhängig von der Ribosomenbindestelle (RBS) ist. Schon kleine Veränderungen in der Sequenz der RBS können die Affinität zur kleinen Ribosomenuntereinheit 16S beeinträchtigen und erhebliche Unterschiede bei der Translation hinsichtlich Beginn und Effektivität bewirken (Welch *et al.*, 2011). Daher wurde die RBS des Xylose-induzierbaren Vektorsystems auf dem

B. megaterium Expressionsplasmid so optimiert, dass sie komplementär zum 3'-Terminus der 16S rRNA des *B. megaterium* Ribosoms ist (Malten *et al.*, 2005a) (Abb. 2). Durch diese Veränderung konnte der GFP Ertrag um das 2-fache gesteigert werden (Stammen *et al.*, 2010a).

Weiterhin hängt die Effizienz der Translation von der Stabilität und der Halbwertszeit der mRNA ab. So können RNasen wie die Endonuklease RNase K als auch Exonukleasen wie RNase II die Ziel-mRNA abbauen, so dass sie nicht mehr translatiert werden kann. Allerdings wurde gezeigt, dass Haarnadelschleifen in der 5' bzw. 3' untranslatierten Region (UTR) vor Degradation schützen können (Belasco, 1993). Daher wurde die Sequenz um die XylR-Bindestelle im *B. megaterium* Xylose-induzierbaren Promotorsystem so verändert, dass die mRNA des Zielproteins an der 5' UTR eine Haarnadelstruktur ausbildet (Stammen *et al.*, 2010a) (Abb. 2). Aufgrund der verlängerten Halbwertszeit der mRNA konnte eine 4-fach höhere Menge an rekombinantem GFP erzielt werden (Stammen *et al.*, 2010a).

Ein weiterer wichtiger Faktor der Translationseffizienz ist der Codongebrauch der Ziel-mRNA. Wenn sich diese stark von der des Wirtes unterscheidet, kommt es zu einer verlangsamen oder sogar zum vorzeitigem Abbruch der Translation (Kane, 1995), was sich negativ auf den Proteinertrag auswirkt. Eine Möglichkeit, dieses Problem zu umgehen ist, die Codonsequenz des Zielgens an den Codongebrauch des Wirtes anzupassen. Im Falle der Hydrolase aus *Thermobifida fusca* (TFH) und der Formiatdehydrogenase aus *Mycobacterium vaccae* (FDH) konnte deren rekombinante Produktion mit *B. megaterium* gesteigert werden, nachdem die entsprechenden Gene an dessen Codongebrauch adaptiert worden waren (Yang *et al.*, 2007; Bäumchen *et al.*, 2007). Die synthetische Herstellung eines Gens ist jedoch mit Kosten- und Zeitaufwand verbunden, was die Entwicklung einer Alternativstrategie wünschenswert macht.

Ein weiteres Problem bei der rekombinanten Proteinproduktion ist, dass die Proteine nach erfolgreicher Translation nicht richtig gefaltet werden und aggregieren. Dies kann unter anderem darauf zurückgeführt werden, dass nicht genügend zelluläre Chaperone zur Verfügung stehen (Schlieker *et al.*, 2002). Diese vermitteln Proteinfaltung und sorgen zusätzlich dafür, dass Pre-Proteine in einer Konformation verharren, die ihre Translokation ermöglicht (Yuan & Wong, 1995). Für *E. coli* und *B. subtilis* konnte gezeigt werden, dass die Coproduktion molekularer Chaperone wie GroEL, DnaK und GrpE in einigen Fällen die Löslichkeit des rekombinant produzierten Proteins erhöhen und dadurch ein höherer Proteinertrag erzielt werden kann (Wong, 1995; Marco *et al.*, 2007). Allerdings ist diese Strategie nicht immer erfolgreich, da die Vorhersage, welches Chaperon die Faltung eines bestimmten Proteins vermittelt oder ob eventuell mehr als ein Chaperon für die Faltung benötigt wird, noch nicht möglich ist. In *B. megaterium* konnte durch Coproduktion von GroEL und DnaK keine Steigerung der Ausbeute an rekombinant produzierter Glycosyltransferase aus *Leuconostoc mesenteroides* beobachtet werden (Wang *et al.*, 2005). Es ist aber nicht auszuschließen,

dass die Coproduktion dieser Chaperone in Kombination mit einem anderen zu produzierenden Protein oder die Coproduktion von anderen Chaperonen sich positiv auf den rekombinanten Proteinertrag auswirken könnten.

1.2.5 Verbesserung der Sekretionseffizienz und Exo-Proteinstabilität

Bei Gram positiven Bakterien wird der größte Anteil der exportierten Proteine über den Sec-Transportweg sekretiert (Tjalsma *et al.*, 2004), weshalb dieser auch für die Ausschleusung rekombinant produzierter Proteine bei *B. megaterium* gewählt wurde (Malten *et al.*, 2005a). Um dabei den Transport aus der Zelle zuverlässig zu vermitteln, muss das Zielprotein mit einem funktionalen Signalpeptid versehen sein. In einer früheren Studie mit *B. megaterium* war festgestellt worden, dass die *B. megaterium* eigene Esterase LipA in hohen Mengen in den Kulturüberstand sekretiert wird (Ruiz *et al.*, 2002). Basierend auf den schon bestehenden Xylose-induzierbaren Expressionsvektoren wurde eine neue Reihe von Vektoren konstruiert, die upstream der MCS die Sequenz des Signalpeptids SP_{LipA} enthalten (Malten *et al.*, 2006) (Abb. 2). Verschiedene Proteine wie die Levansucrase aus *Lactobacillus reuteri* oder die Hydrolase aus *T. fusca*, die mit SP_{LipA} fusioniert waren, konnten erfolgreich sekretiert werden (Malten *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2007). Aber auch der Export normalerweise nicht sekretierter Proteine wie Hydrophobine (Gamer, 2009) oder Antikörperfragmente (Jordan *et al.*, 2007) gelang erfolgreich mit *B. megaterium*.

Die Eigenschaften des Signalpeptids spielen dabei eine wichtige Rolle für die Sekretionseffizienz. Jedoch vermitteln auch als optimal vorhergesagte Signalpeptide nicht unbedingt die beste Sekretionsrate, da zusätzlich die Kombination von Signalpeptid und Zielprotein den Prozess beeinflusst (Brockmeier *et al.*, 2006; Stammen *et al.*, 2010a). Um das *B. megaterium* System zu erweitern, wurden in dessen Genom alle Signalpeptide bioinformatisch bestimmt und teilweise experimentell getestet (Stammen *et al.*, 2010a; Knuuti, 2015). Somit stehen nun Expressionsvektoren mit unterschiedlichen Signalpeptidsequenzen zur Verfügung, wobei das Ziel eine Signalpeptidbibliothek ist (Knuuti, 2015).

Auch die Abspaltung des Signalpeptids trägt zu einer effizienten Sekretion bei. Es gibt zwei Arten von Signalpeptidase, die des Typl und des TyplI. Letztere spaltet Signalpeptide von Lipoproteinen, die in oder an der Cytoplasmamembran verankert werden, während die Typl Signalpeptidase die Abspaltung bei vollständig sekretierten Proteinen vermittelt (Pohl & Harwood, 2010). Bei der Überproduktion von Typl Signalpeptidasen in *E. coli* und in Insektenzellen konnte eine Ertragssteigerung des sekretierten rekombinanten Zielproteins beobachtet werden (van Dijk *et al.*, 1991; Ailor *et al.*, 1999), was einen Engpass im Sekretionsprozess andeutet. In *B. megaterium* wurde bisher eine Typl Signalpeptidase (SipM) identifiziert (Nahrstedt *et al.*, 2004). Durch die Coproduktion von SipM konnte auch in *B. megaterium* der Ertrag an sekretierter rekombinanter Dextransucrase DsrS 3-fach gesteigert werden (Malten *et al.*, 2005b) (Abb. 2).

Nach der erfolgreichen Sekretion des Zielproteins ist eine hohe Stabilität im Wachstumsmedium von großer Wichtigkeit. Bakterien besitzen Membran-gebundene und extrazellulären Proteasen, deren Aufgabe darin besteht, falsch gefaltete Proteine abzubauen (Qualitätskontrolle) oder aber Nährstoffe durch den Abbau von Proteinen bzw. Peptiden aus der Umgebung der Zelle zu Verfügung zu stellen (Nährstoffversorgung). *B. subtilis* produziert eine Vielzahl solcher Proteasen, die Proteine degradieren und sich damit auch negativ auf den Ertrag rekombinanter Proteine auswirken (Harwood & Cranenburgh, 2008). *B. megaterium* dagegen besitzt nur wenige extrazelluläre Proteasen. Im Stamm DSM319 wurde bisher nur eine neutrale Protease NprM identifiziert. Durch die Deletion dieser Protease konnte die extrazelluläre Proteaseaktivität auf 1,4 % reduziert werden, was so auch eine größere Stabilität der sekretierten Zielproteine im Kulturüberstand bewirkte (Wittchen & Meinhardt, 1995; Malten *et al.*, 2005a) (Abb. 2).

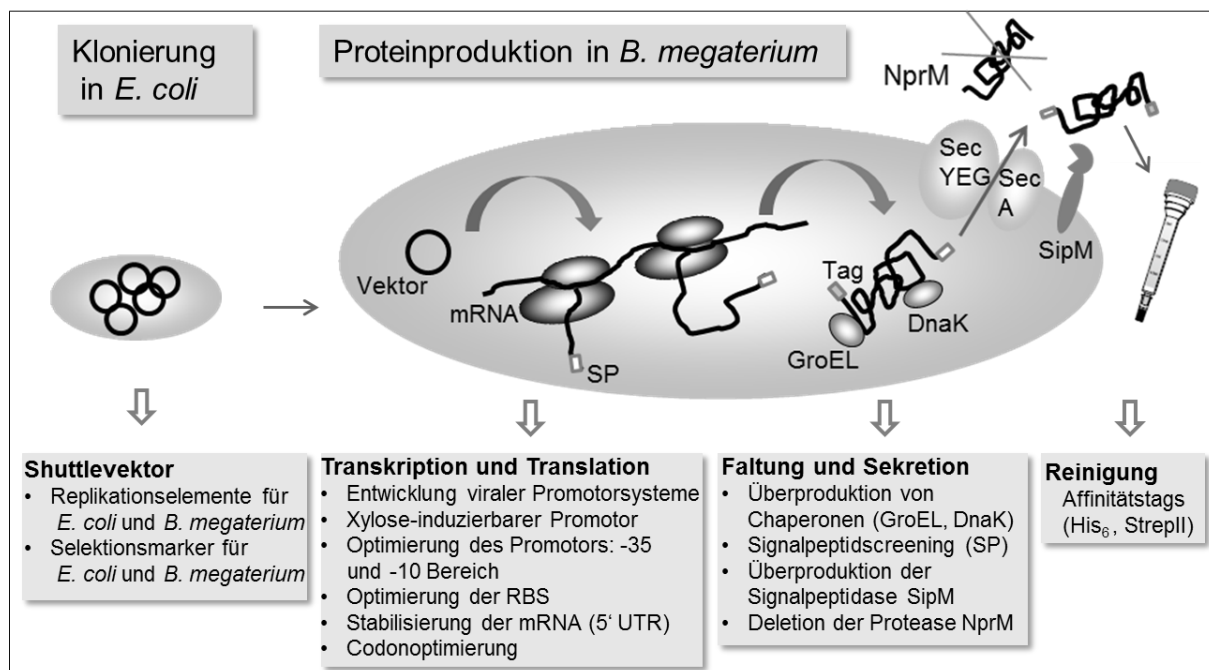


Abb. 2: Gentechnische Strategien für die Optimierung der rekombinanten Proteinproduktion in *B. megaterium*.

1.2.6 Globales Verständnis der rekombinanten Proteinproduktion in *Bacillus megaterium*

B. megaterium konnte in den letzten Jahren als Produktionswirt für rekombinante Proteine etabliert werden. So steht eine breite Palette an Expressionsplasmiden, die die Grundlage für eine erfolgreiche rekombinante Proteinproduktion bieten, zur Verfügung. Zudem wurden zusätzliche Strategien wie Coproduktion bestimmter Proteine bzw. Manipulation des Wirtes durch Knockout angewandt (Biedendieck *et al.*, 2011), um die rekombinante Proteinproduktion zu steigern. Systembiologische Ansätze darunter Transkriptom-, Proteom-, Metabolom- und Fluxomanalysen und entsprechende bioinformatische Methoden, um diese Daten zu bündeln, ermöglichen einen ganzheitlichen Blick auf den Produktionsstamm *B. megaterium* (Fürch *et al.*, 2007; Biedendieck *et al.*, 2010a; Biedendieck *et*

al., 2011; Korneli *et al.*, 2013). So können Engpässe bei der rekombinanten Proteinproduktion aufgedeckt und weitere gentechnische Maßnahmen zur Optimierung der rekombinanten Proteinproduktion und -sekretion ergriffen werden. Grundlage dafür ist die vollständige Sequenzierung des *B. megaterium* Genoms (Eppinger *et al.*, 2011). Dies erlaubte auch den Codongebrauch von *B. megaterium* zu bestimmen (Gamer, 2009) und so Lösungsansätze zur Überwindung der Diskrepanz zwischen Codongebrauch in *B. megaterium* und zu exprimierender heterologer Gene zu entwickeln.

1.3 Genetischer Code und Codongebrauch

Der genetische Code setzt sich aus 64 Codons zusammen, die 20 Aminosäuren und drei Stopp-Codons codieren. Man spricht daher von einem degenerierten Code, da mehrere Codons (synonyme Codons) die gleiche Aminosäure verschlüsseln. Allerdings existieren in Zellen nur etwa 40 verschiedene *tRNA*-Gene (Agris *et al.*, 2007), was bedeutet, dass eine *tRNA* mehr als ein Codon erkennen muss. Dazu postulierte Crick 1966 die sogenannte „Wobble Hypothese“ (Crick, 1966). Dabei ging er davon aus, dass die 3'-Anticodon-Base (N_{36}) und die darauffolgende Base des Anticodons (N_{35}) komplementär mit der 5'-Codon-Base (N_1) und der darauffolgende Base des Codons (N_2) paaren, dass es aber bei der Paarung zwischen der 5'-Anticodon-Base (N_{34}) und der 3'-Codon-Base (N_3) zu Abweichungen kommen kann (Wobble-Paarung). So kann Uridin an der 5'-Position des Anticodons (N_{34}) sowohl mit Adenosin als auch mit Guanotin an der 3'-Position des Codons (N_3) paaren und Guanotin (N_{34}) nicht nur mit Cytosin (N_3) sondern auch mit Uridin (N_3) (Tab. 1). Dies greift beispielsweise für die *tRNA* mit dem Anticodon 3'-AAG-5', welche sowohl mit dem Codon 5'-UUC-3' als auch mit 5'-UUU-3' paaren kann, wobei beide Codons für Phenylalanin codieren. Er erkannte außerdem, dass Inosin, ein ausschließlich an der Wobble-Position des Anticodons (N_{34}) vorkommendes Derivat von Adenosin, in der Lage ist mit Adenosin, Uridin und Cytidin an der 3'-Position des Codons (N_3) Basenpaarungen einzugehen (Tab. 1). Inzwischen wurden zusätzlich verschiedene posttranskriptionale Basenmodifikationen innerhalb des Anticodons entdeckt, die sich auf die Paarungseigenschaften auswirken (Agris *et al.*, 2007; Gustilo *et al.*, 2008). Beispielsweise führt eine spezielle Modifikation des Uridins (Uridin-5-Oxyetahnsäure) an der 5'-Anticodonposition (N_{34}) dazu, dass es mit Adenosin, Uridin, Cytidin und Guanotin paaren kann (Nasvall *et al.*, 2004).

Tab. 1: Wobble-Basenpaarungen zwischen Anticodon und Codon nach Crick, 1966.

5'- Anticodon-Base (N_{34})	3'- Codon-Base (N_3)
G	C, U
C	G
A	U
U	A, G
I	U, C, A

Der genetische Code ist universell. Diese Eigenschaft ist Voraussetzung für die rekombinante Proteinproduktion, denn nur so wird es möglich Gene, in Wirtsorganismen zu exprimieren, die nicht aus diesem stammen. Allerdings unterscheiden sich Organismen nicht nur darin, welches synonyme Codon bevorzugt bzw. selten für die Codierung einer Aminosäure verwendet wird, sondern auch hinsichtlich ihrer Ausstattung an *tRNAs*, da das Vorkommen entsprechender *tRNAs* mit der Häufigkeit des jeweiligen Codons korreliert (Ikemura, 1981). Eine Übersicht unterschiedlicher Codon-

präferenzen von acht gut untersuchten Organismen ist in Abbildung 3 graphisch dargestellt. Die Variationen im Codongebrauch sind auf den unterschiedlichen GC-Gehalt der Genome zurückzuführen. *Streptomyces coelicolor* beispielsweise besitzt einen GC-Gehalt von 71 %, wobei fast jede Wobble-Position mit einem G oder C besetzt ist. Dies resultiert beim Vergleich mit anderen Organismen in einem extremen Codongebrauchsprofil (Abb. 3). *Arabidopsis thaliana*, *Saccharomyces cerevisiae* und *Caenorhabditis elegans* haben einen ähnlichen Codongebrauch, weshalb sie eng beieinanderliegen, während sich *Homo sapiens* deutlich von *E. coli* oder *B. subtilis* in der Codonpräferenz unterscheidet (Abb. 3).

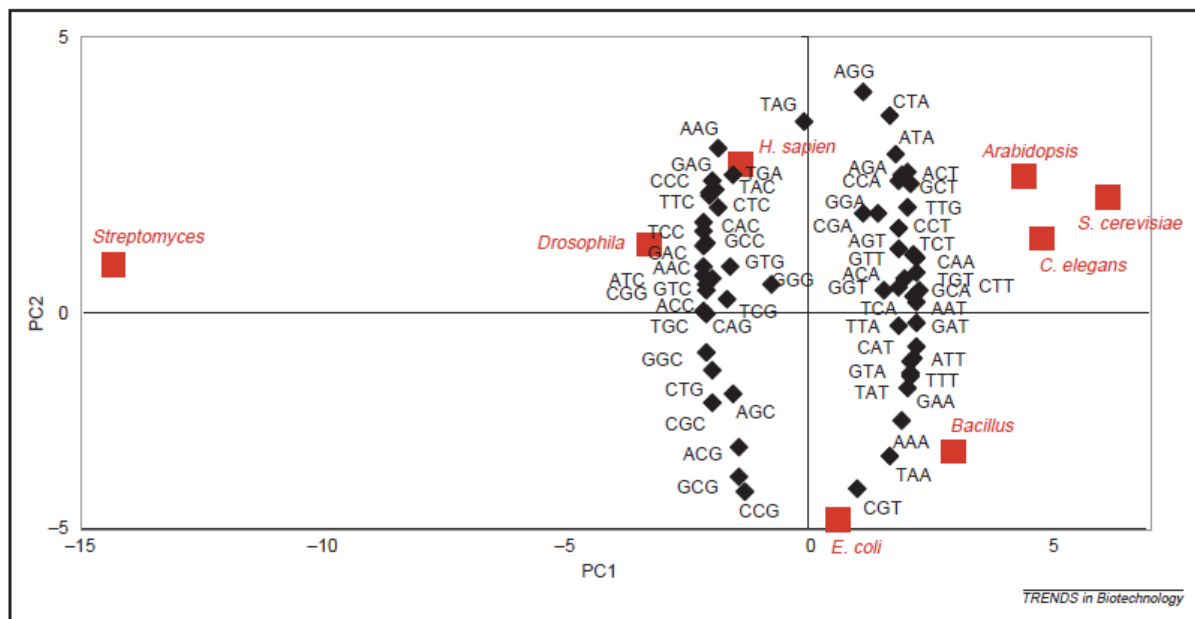


Abb. 3: Graphische Darstellung der Codonusage verschiedener Organismen (aus Gustafsson et al. (2004)). Die Graphik wurde mithilfe der Hauptkomponentenanalyse (engl.: Principle component analysis, PCA) erstellt. Hierbei werden eine Vielzahl an statistischen Variablen zu einer geringeren Anzahl möglichst aussagekräftiger Variablen zusammengefasst (hier: PC1 und PC2). Für die Analyse wurde die Codonhäufigkeit in allen ORFs von acht verschiedenen Organismen erfasst und mit diesen Daten ein „Codonuseraum“ aufgespannt. Anhand ihrer Codonpräferenzen wurde die Position der verschiedenen Organismen bestimmt. *Streptomyces* = *Streptomyces coelicolor*; *Drosophila* = *Drosophila melanogaster*; *Arabidopsis* = *Arabidopsis thaliana*; *Bacillus* = *Bacillus subtilis*.

Der Codongebrauch kann nicht nur zwischen Organismen, sondern auch zwischen unterschiedlichen Genen im selben Organismus variieren. Gene mit hohem Expressionslevel sind einer stärkeren translationalen Selektion unterworfen und weisen daher in höherem Maß bevorzugte Codons auf (Gouy & Gautier, 1982; Plotkin & Kudla, 2011). Diese können schneller und genauer translatiert werden, weil die korrespondierenden tRNAs in adäquaten Mengen vorliegen (Sorensen et al., 1989). So wird die Translationseffizienz gesteigert, was eine erhöhte Syntheserate des Proteins nach sich zieht (Gustafsson et al., 2004). Zusätzlich wird angenommen, dass die Ribosomen schneller über die mRNA gleiten, schneller freigesetzt werden und schneller für andere mRNAs zur Verfügung stehen. Dies resultiert in einer erhöhten Zellfitness und schnellerem Wachstum und stellt damit einen Selektionsvorteil dar (Kudla et al., 2009; Sharp et al., 2010).

Bei der rekombinanten Proteinproduktion kann ein unterschiedlicher Codongebrauch des Wirtes und des zu exprimierenden Gens zu Problemen führen. Es ist bekannt, dass sich menschliche Proteine zum Teil schlecht oder gar nicht in *E. coli* produzieren lassen, da deren kodierende Sequenz einige Codons besitzen, die in *E. coli* selten vorkommen (Terpe, 2006; Tegel *et al.*, 2010). Beispielsweise wird im menschlichen Genom Arginin bevorzugt durch die Codons AGG und AGA codiert (je 11,4 %), während diese in *E. coli* nur mit einer Häufigkeit von 2,1 % bzw. 2,4 % für die Verschlüsselung von Arginin genutzt werden (Gustafsson *et al.*, 2004). Bei der Untersuchung der Auswirkungen von selten vorkommenden Codons auf die Proteinproduktion wurde festgestellt, dass vor allem mehrere aufeinanderfolgende seltene Codons (Cluster von seltenen Codons) zu negativen Effekten wie verfrühtem Peptidkettenabbruch und Frameshifts führten, da aufgrund der niedrigen Konzentration der zugehörigen tRNA diese beim Translationsvorgang erst verzögert zur Verfügung steht, was so in Stagnation, Springen oder vorzeitigem Abfallen des Ribosoms resultieren kann (Rosenberg *et al.*, 1993; Spanjaard & van Duin, 1988; Kane, 1995).

Ein Maß für die Anpassung des Codongebrauchs eines Gens an den des Wirts stellt der Codon Adaptation Index (CAI) dar (Sharp & Li, 1987). Zu dessen Berechnung werden mehrere stark exprimierte Gene herangezogen und aus deren Sequenz die relative Anpassung eines Codons bestimmt. Dabei werden die Codons einer Aminosäure auf das am häufigsten vorkommende Codon normiert. Der CAI eines Gens ist der Quotient aus der Summe der relativen Anpassung der vorkommenden Codons und der Gesamtanzahl der Codons im Gen. Das Ergebnis kann einen Wert von ≤ 1 annehmen, wobei ein CAI von 1 einer idealen Anpassung entspricht. Eine andere, eher weniger gebräuchliche Möglichkeit eine Aussage über die Codonusage zu treffen, ist der tRNA Adaptation Index (tAI). Hierbei wird die Gewichtung der Codons nicht über deren Häufigkeit, sondern über die Genkopienanzahl bzw. die Konzentration der korrespondierenden tRNA getroffen (dos Reis *et al.*, 2003).

Um die Expression eines heterologen Gens, dessen Codonpräferenz erheblich von der des Wirtes abweicht, zu ermöglichen, gibt es unterschiedliche Möglichkeiten. Entweder werden die Codons des zu exprimierenden Gens an den Codongebrauch des Wirtes adaptiert oder der Wirt wird mit entsprechenden tRNAs supplementiert, um eine einwandfreie Translation der heterologen mRNA zu gewährleisten.

1.3.1 Optimierung und Anpassung von Gensequenzen

Die Optimierung einer Gensequenz kann entweder über spezifisch eingeführte stille Mutationen oder einer *de novo* Synthese von Teilen des Gens oder des gesamten Gens erfolgen, wobei die Aminosäureabfolge nicht verändert wird. Dabei gibt es verschiedene Strategien, eine Gensequenz hinsichtlich der Codonpräferenz zu optimieren. Bei der „one amino acid-one codon“ Methode wird

die Gensequenz aus denjenigen Codons zusammengesetzt, die im Wirt mit höchster Präferenz für die jeweilige Aminosäure verwendet werden (Fuglsang, 2003). Der Nachteil bei dieser Strategie ist jedoch, dass durch die vermehrte Verwendung bestimmter Codons der tRNA Pool aus dem Gleichgewicht gerät, was zu einem verlangsamten Wachstum des Wirtes führen kann (Gong *et al.*, 2006). Bei der „Codon Randomization“ Methode werden Codons nach ihrer Häufigkeitsverteilung im gesamten Genom oder innerhalb stark exprimierter Gene gewichtet. Diese Gewichtung entspricht der Wahrscheinlichkeit, mit welcher sie bei der Optimierung der Gensequenz eingesetzt werden (Welch *et al.*, 2009). Diese Strategie hat sich als vorteilhaft erwiesen und wird heute standardmäßig angewandt (Elena *et al.*, 2014). Basierend auf dieser Methode zeigten Elf und Kollegen, dass eine effektive Translation nicht nur von der Häufigkeit der Codons und damit der Verfügbarkeit von tRNAs, sondern auch von der Beladung der tRNAs abhängt. Sie fanden heraus, dass die Beladung der tRNAs unter limitierten Nährstoffbedingungen variiert, und schlugen vor, auch diesen Parameter beim Optimierungsprozess miteinfließen zu lassen („starvation codon adaptation index (sCAI)“) (Elf *et al.*, 2003). Außerdem kann eine flächendeckende Substitution von synonymen Codons zu Unlöslichkeit oder Inaktivität des produzierten Proteins führen (Cortazzo *et al.*, 2002; Komar *et al.*, 1999). Man geht davon aus, dass der Austausch von Codons die Translationsgeschwindigkeit und damit die Faltung des Proteins beeinflusst (Angov, 2011). Daher wurde eine weitere Art der Optimierung eingebracht, „Codon Harmonization“, bei der an bestimmten vorhergesagten Stellen selten vorkommende Codons platziert werden (Angov *et al.*, 2008).

Neben dem Codongebrauch können einige weitere Faktoren ebenfalls die Translationseffizienz beeinträchtigen. So behindern ausgeprägte Sekundärstrukturen der mRNA die Translationsinitiation und -elongation (Kudla *et al.*, 2009; Tuller *et al.*, 2010). Die Codon-optimierte Sequenz sollte zudem keine internen RBS oder andere cis-wirksame Elemente enthalten, damit keine verkürzten mRNA-Sequenzen entstehen bzw. die Transkription nicht negativ beeinflusst wird (Maertens *et al.*, 2010). Auch gilt es, Erkennungssequenzen von Restriktionsenzymen zu vermeiden, um die Klonierung des Gens nicht zu beeinträchtigen (Gustafsson *et al.*, 2004). Inzwischen ist eine Fülle an Web-basierten, kostenlosen Optimierungssoftwares wie Optimizer (Puigbo *et al.*, 2007), Gene designer (Villalobos *et al.*, 2006) oder JCat (Grote *et al.*, 2005) verfügbar, mit deren Hilfe DNA-Sequenzen für Zielproteine erstellt werden können, die hinsichtlich verschiedener Parameter optimiert sind. In der Regel führt die Optimierung der Gensequenz zu einer Erhöhung der Translationseffizienz und damit zur verbesserten Produktion von rekombinanten Proteinen, die zuvor schlecht oder überhaupt nicht produziert werden konnten (Williams *et al.*, 1988; Hale & Thompson, 1998; Li *et al.*, 2002; Burgess-Brown *et al.*, 2008; Maertens *et al.*, 2010).

Soll allerdings ein umfangreiches Screening von verschiedenen Proteinen stattfinden, ist diese Methode aufgrund des Zeitaufwandes und der anfallenden Kosten für die synthetische Herstellung der Gensequenzen bzw. Einführung der Mutationen nicht optimal.

1.3.2 *tRNA-Supplementation von bakteriellen Expressionsstämmen*

Um einen Stamm mit tRNAs zu supplementieren, werden plasmidbasierte *tRNA*-Gene in den Stamm eingeführt. Mit dieser Vervielfachung der *tRNA*-Gene steigt die Konzentration entsprechender tRNAs, da die Kopienanzahl der *tRNA*-Gene mit der tRNA Konzentration korreliert (Kanaya *et al.*, 1999). Die ersten Arbeiten zur zusätzlichen Produktion von einzelnen tRNAs im Expressionswirt *E. coli* fanden Ende der 80er Jahre statt. Brinkmann und Kollegen transfizierten *E. coli* Zellen mit dem *argU*-Gen (*dnaY*), das die tRNA codiert, welche die in *E. coli* selten vorkommenden Codons AGA/AGG bedient. Die *dnaY*-Expression zusammen mit dem Gen des HIV Glycoproteins 41 (HIV-gp41), dessen Gensequenz diese seltenen Codons enthielt, bewirkte die Produktion von HIV-gp41, welches ohne zusätzliche Expression von *dnaY* nicht in *E. coli* produziert werden konnte (Brinkmann *et al.*, 1989). Spanjaard und Kollegen gelang die Supression von Frameshifts, hervorgerufen von zwei aufeinanderfolgenden AGA Codons, durch die Coexpression von *argU* (Spanjaard *et al.*, 1990). Auch die Coexpression des *ileX*-Gens, das die tRNA codiert, welches das in *E. coli* selten vorkommende Codon AUA bedient, führte zu einer gesteigerten Produktion eines Influenzavirusproteins, dessen Sequenz zu 3,9 % dieses Codon enthielt (Del Tito *et al.*, 1995). Baca und Hol konstruierten den Vektor pRIG, der drei verschiedenen *tRNA*-Gene (*argU* (einzeln), *ileX* (einzeln) und *glyT* (zusammen mit drei weiteren *tRNA*-Genen)) unter der Kontrolle ihrer nativen Promotoren enthält. Die Anwesenheit dieses Vektors in der *E. coli* Zelle bewirkte die gesteigerte Produktion mehrerer Proteine, die im AT-reichen Genom von *Plasmodium* codiert sind (Baca & Hol, 2000). Basierend auf diesem Vektor entwickelte Novagen pRARE. Dieser Vektor trägt 10 verschiedene *tRNA*-Gene, darunter 6 Gene von in *E. coli* selten vorkommenden tRNAs (2 x *argU* (jeweils einzeln vorliegend), *ileX* (einzeln), *glyT* (zusammen mit drei weiteren *tRNA*-Genen), *leuW* (zusammen mit einem weiteren *tRNA*-Gen) und *proL* (einzeln) (Novy *et al.*, 2001) (Abb. 4).

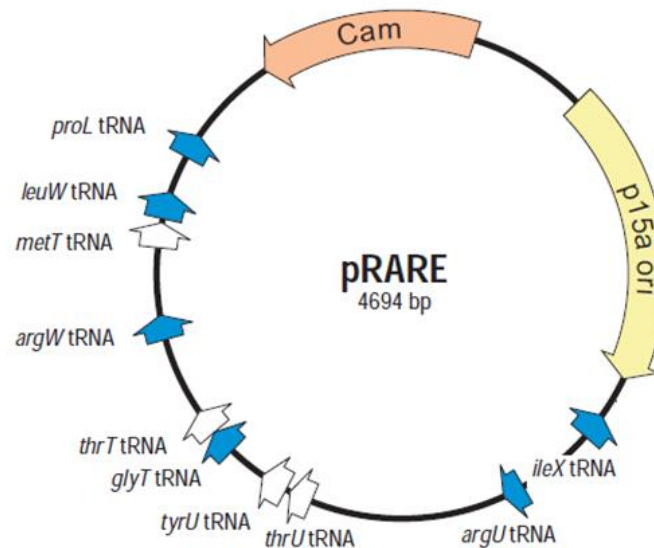


Abb. 4: Graphische Darstellung des pRARE-Vektors von Novagen (verändert nach Novy *et al.* (2001)). Gezeigt ist der Vektor pRARE von Novagen zur Coexpression von *tRNA*-Genen in *E. coli*. Die *tRNA*-Gene sind als Pfeile dargestellt, wobei die Gene für seltene Codons blau markiert sind. Des Weiteren trägt der Vektor eine Chloramphenicolresistenz (*Cam*, rot), sowie den Replikationsursprung (*p15a ori*, gelb).

Neben Veröffentlichungen, die zeigen, dass bei Coproduktion von tRNAs das rekombinanten Zielprotein unlöslich war (Rosano & Ceccarelli, 2009) oder Wachstumsstörungen des Expressionsstammes auftraten (Wahab *et al.*, 1993), konnte auch gezeigt werden, dass der Einsatz von kommerziell erhältlichen tRNA-Vektoren zu erhöhten Ausbeuten des rekombinanten Proteins führt (Kleber-Janke & Becker, 2000; Kim & Lee, 2006; Fu *et al.*, 2007; Pranchevicius *et al.*, 2012; Indiveri *et al.*, 2013). In einer Studie, in der die Produktion von 30 humanen Proteinen untersucht wurde, stellte sich heraus, dass die Erträge der Proteine, deren codierenden Sequenz zuvor an den Codongebrauch des Wirtes angepasst wurde, mit den Ausbeuten der Proteine vergleichbar waren, deren native codierende Sequenz beibehalten und die in tRNA-supplementierten *E. coli* Stämmen produziert wurden (Burgess-Brown *et al.*, 2008). Insbesondere für Protein-Screenings ist die kostengünstigere und zeitsparende Methode der tRNA-Supplementation von Expressionsstämmen gegenüber der Codonoptimierung der Gensequenz vorteilhaft (Tegel *et al.*, 2010). Bisher sind allerdings nur tRNA-supplementierte *E. coli* Stämme verfügbar. Sollen heterologe Gene in alternativen Wirten produziert werden, bleibt bislang nur die Option der Codonadaptation. Die Entwicklung von ähnlichen Systemen für alternative Expressionswirte ist daher von großem Interesse.

1.4 Tetrapyrrole

Jeder kennt die Farbbezeichnungen „grasgrün“ und „blutrot“, aber was macht das Gras grün und das Blut rot? In den 1930er Jahren gelang es den Pionieren Richard Willstätter und Hans Fischer nach langwierigen Degradationsexperimenten und durch kombinatorische Meisterleistung, die komplexen Strukturen der Makromoleküle, die für diese Farbgebung verantwortlich sind, das Chlorophyll und das Häm (Häm *b*) des Hämoglobins, zu beschreiben (Battersby, 2000). Obwohl Erscheinungsbild und Funktion dieser Stoffe stark differieren, stellte sich heraus, dass sie strukturelle Verwandtschaft zeigten und daher in eine bis dahin nicht nachgewiesene Verbindungsklasse, die der Tetrapyrrole, einzuordnen waren.

1.4.1 Struktur und Funktion der Tetrapyrrole

Tetrapyrrole sind lineare oder makrozyklische Naturstoffe. Sie bestehen aus vier Pyrrolringen, die über drei bzw. vier Brückenatome verknüpft sind (Abb. 5). Lineare Tetrapyrrole wie beispielsweise Gallenfarbstoffe werden systematisch als substituierte Bilane bezeichnet und entstehen, indem der Ring von zuvor zyklischen Tetrapyrrolen geöffnet wird (Heinemann *et al.*, 2008) (Abb. 5 I). Die zyklischen Tetrapyrrole werden in substituierte Corrine, wie etwa Vitamin B₁₂, und substituierte Porphyrine, wozu auch Häm zählt, unterteilt (Abb. 5 II und III). Aufgrund eines ausgedehnten π -Elektronensystems besitzen viele Tetrapyrrole die Fähigkeit, einen Teil des sichtbaren Lichts zu absorbieren, wodurch sie farbig erscheinen (Battersby, 1988).

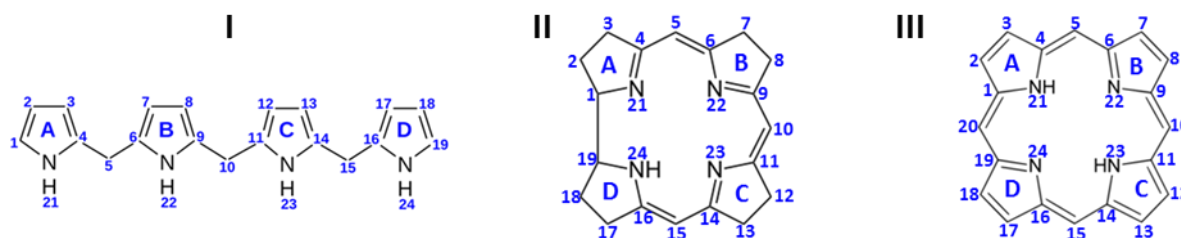


Abb. 5: Allgemeine Struktur verschiedener Tetrapyrrole. I) Bilan, II) Corrin, III) Porphyrin mit Benennung der Pyrrolringe (A-D) und der Nummerierung der Kohlenstoffatome (C1-C20) bzw. der Stickstoffatome (N21-N24) nach den Richtlinien der „International Union of Pure and Applied Chemistry“ (IUPAC). C20 ist bei der Bilan (I) und Corrin (II) Grundstruktur nicht vorhanden.

Tetrapyrrole werden von allen lebenden Organismen gebildet und sind für die Existenz der Prokaryoten, Eukaryoten und Archaeen essentiell (Avissar & Moberg, 1995). Durch die Diversität der Ringsubstituenten, ihre unterschiedlichen Oxidationszustände und die Eigenschaft zyklischer Tetrapyrrole, verschiedene Metallionen zu komplexieren, ergibt sich eine große Funktionsvielfalt dieser Stoffklasse (Jahn *et al.*, 1996) (Abb. 6). Das nickelhaltige Coenzym F₄₃₀ wie auch die eisenhaltigen Sirohäm und Häm *d*₁ fungieren als prosthetische Gruppe von verschiedenen Reduktasen, die an der biologischen Methanbildung, der Stickstoff- bzw. Schwefelassimilierung und der dissimilatorischen Denitrifikation beteiligt sind (Thauer & Bonacker, 1994; Raux *et al.*, 2003;

Chang, 1994). Cobalamine, wie Vitamin B₁₂ (Abb. 6), besitzen Cobalt als Zentralatom und sind in verschiedenen enzymatischen Umlagerungsreaktionen im Rahmen des Aminosäure- und Nukleotidmetabolismus involviert (Gruber *et al.*, 2011). In Pflanzen und photosynthetischen Bakterien spielen Magnesium-haltige Tetrapyrrole wie Chlorophylle und Bakteriochlorophylle eine Rolle als Photorezeptoren und sind zudem an der Umwandlung der Lichtenergie in chemische Energie beteiligt. Das eisenhaltige Häm (Häm *b*) findet man als prosthetische Gruppe von Hämoglobin, das für den Sauerstofftransport im Blut verantwortlich ist, und in Katalasen und Peroxidasen, die Entgiftungsreaktionen in Zellen katalysieren (Chelikani *et al.*, 2004). Aber auch in Cytochromen, die den Elektronentransfer gewährleisten sowie die terminale Reduktion von Sauerstoff oder alternativen Elektronenakzeptoren vermittelt, sind Häm-Derivate als prosthetische Gruppe vorhanden. Des Weiteren kann Häm in Signaltransduktionswegen als Sensormolekül für Sauerstoff, Kohlenstoffmonoxid und Stickstoffmonoxid fungieren (Rodgers, 1999). Lineare Tetrapyrrole hingegen besitzen kein zentrales Metallion. Sie werden in Gallenfarbstoffe (z.B. Bilirubin (Abb. 6)), Chlorophyllabbauprodukte und Phycobiline unterteilt. Letztere dienen in Cyanobakterien als akzessorische Pigmente der Photosynthese (Frankenberg *et al.*, 2003).

Während Häm, Sirohäm, Chlorophyll und Biline auch von Eukaryoten synthetisiert werden können, ist die Biosynthese der komplexen Corrine (wie Vitamin B₁₂), Häm *d*₁ und Coenzym F₄₃₀ nur den Prokaryoten möglich (Vavilin & Vermaas, 2002; Frankenberg *et al.*, 2003).

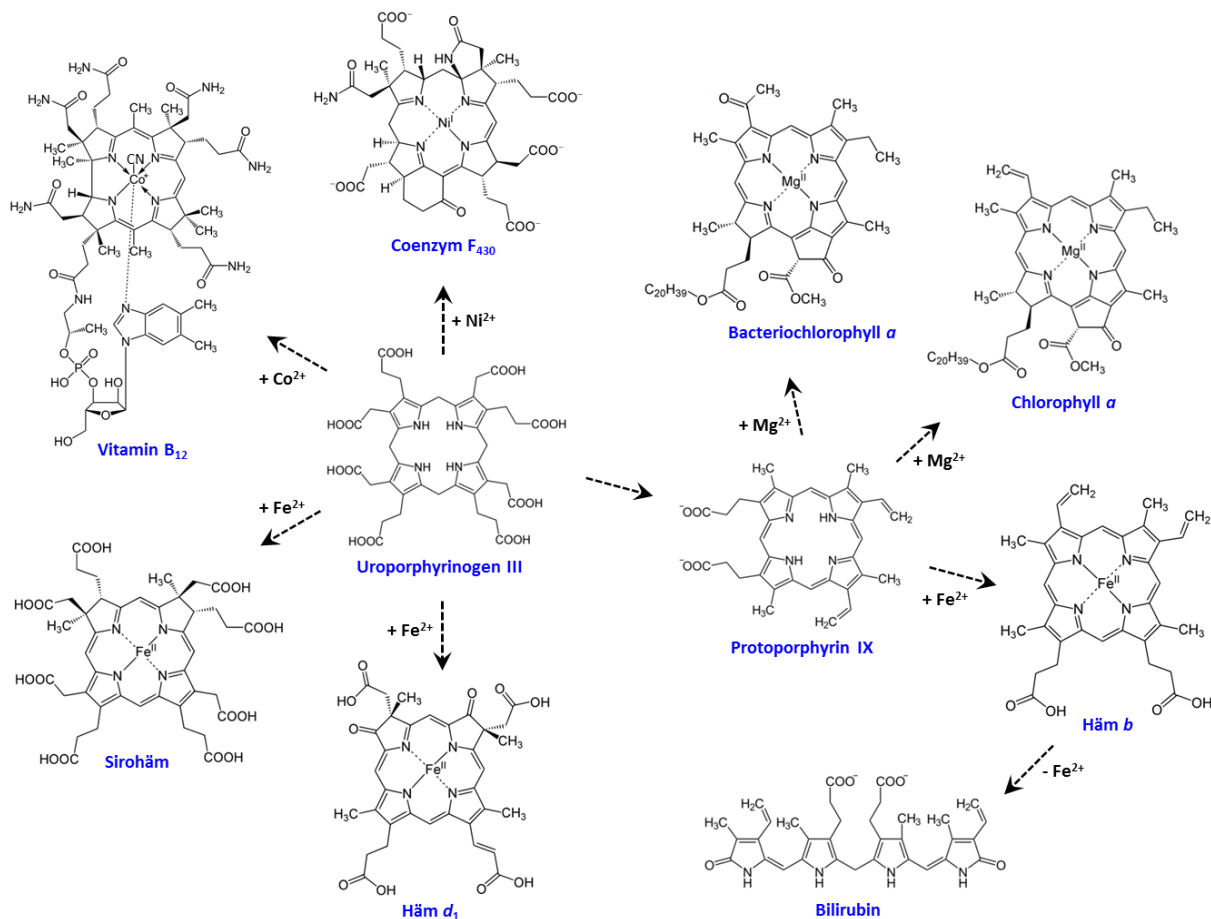


Abb. 6: Strukturen biologisch relevanter Tetrapyrrole. Dargestellt sind Porphyrine mit vollständig gesättigtem Ringsystem (Häm b, Chlorophyll a und Bacteriochlorophyll a), reduzierte zyklische Tetrapyrrole (Coenzym F_{430} , Sirohäm und Häm d_1), ein Corrin (Vitamin B_{12}), ein Bilan (Bilirubin) sowie die Vorläufermoleküle Uroporphyrinogen III und Protoporphyrin IX.

1.4.2 Tetrapyrrolbiosynthese im Überblick

Die meisten Schritte der Tetrapyrrolbiosynthese sind hochkonserviert und laufen in nahezu allen Zellen ab. Das gemeinsame Vorläufermolekül aller Tetrapyrrole ist die 5-Aminolävulinsäure (ALA), die auf zwei Wegen synthetisiert werden kann (Abb. 7a und b). Säuger, Vögel, Pilze und α -Proteobakterien nutzen den nach seinem Entdecker benannten Shemin-Weg (Shemin & Russell, 1953). Dabei entsteht durch Kondensation von Succinyl-CoA und Glycin und anschließender Decarboxylierung 5-Aminolävulinsäure (Kikuchi *et al.*, 1958; Gibson *et al.*, 1958). Diese Reaktion wird von der Pyridoxalphosphat-abhängigen 5-Aminolävulinatsynthase (ALAS, kodiert von *hemaA*) katalysiert (Ferreira & Gong, 1995). Bei Pflanzen, Archaeen und den meisten Bakterien wird ALA hingegen über den C_5 -Weg aus Glutamat (C_5 -Gerüst) gebildet (Beale *et al.*, 1975). Die Besonderheit an diesem Schritt ist die Beteiligung einer Transfer-RNA, die mit Glutamat beladen ist (Glutamyl-tRNA) (Jahn *et al.*, 1992). Durch die Glutamyl-tRNA-Reduktase (GluTR, kodiert von *hemaA* bzw. *gluTR*) wird das Glutamat zum instabilen Glutamat-1-Semialdehyd mittels NADPH reduziert, welches von der tRNA abgespalten wird. Anschließend wird dieses von der Pyridoxalphosphat-abhängigen

Glutamat-1-Semialdehydaminomutase (GSAM, kodiert von *hemL*) in 5-Aminolävulinsäure umgewandelt (Ilag & Jahn, 1992).

Bisher ist nur ein Organismus, der Phytoflagellat *Euglena gracilis*, bekannt, welcher sowohl den Shemin- als auch den C₅-Weg für die Hämbiosynthese nutzt (Heinemann *et al.*, 2008). Dabei wird die aus dem Shemin-Weg stammende ALA in mitochondriale Tetrapyrrole eingebaut, während ALA, welche über den C₅-Weg gebildet wird, in den Chloroplasten Verwendung findet (Weinstein & Beale, 1983).

Die nächsten drei enzymatischen Schritte sind bei der Biosynthese aller Tetrapyrrole identisch (Abb. 7c). Die Bildung des Pyrrolderivats Porphobilinogen (PBG) erfolgt durch die asymmetrische Kondensation zweier ALA Moleküle mithilfe des strukturell hochkonservierten Enzyms Porphobilinogensynthase (PBGS, kodiert von *hemB*) (Jordan & Gibbs, 1985). Anschließend verknüpft die Porphobilinogendesaminase HemC (PBGD, auch: Hydroxymethylbilan-Synthase, kodiert von *hemC*) nacheinander vier PBG-Moleküle, wobei das lineare Tetrapyrrol, Preuroporphyrinogen (oder auch 1-Hydroxymethylbilan) entsteht (Burton *et al.*, 1979). Dieses instabile Intermediat wird dann durch Hydrolyse vom Enzym abgespalten. Für die weitere Modifikation des Makromoleküls ist die Asymmetrie des Tetrapyrrols eine notwendige Voraussetzung. Diese wird durch die Uroporphyrinogen-III-Synthase HemD (UROS oder Cosynthase, kodiert von *hemD*) eingeführt, welche die Drehung des D-Rings über eine spirozyklische Zwischenstufe und den Ringschluss katalysiert (Shoolingin-Jordan, 1995). Das so entstandene Uroporphyrinogen III (Uro'gen III) ist somit das erste zyklische Tetrapyrrol im Biosyntheseweg. Gleichzeitig stellt es auch einen Verzweigungspunkt dar, da sich hier die Biosynthesewege von Corrinoiden, Coenzym F₄₃₀, Sirohäm und Häm d₁ trennen (Abb. 7). Die Bildung von Häm (außer das Protohäm bei Archaeen), Bilinen und Chlorophyllen folgt weiterhin einer gemeinsamen Route, bei der in drei aufeinanderfolgenden enzymatischen Schritten die Seitenketten des makrozyklischen Moleküls modifiziert werden. Durch die Uroporphyrinogen-III-Decarboxylase (UROD, kodiert von *hemE*) erfolgt die schrittweise Decarboxylierung der vier Acetylgruppen zu Methylgruppen, wobei Coproporphyrinogen III entsteht (Akhtar, 1991). Zwei Propionatreste werden dann oxidativ zu Vinylgruppen des Protoporphyrinogen IX decarboxyliert. Diese Reaktion kann durch zwei unterschiedliche, weder vom Mechanismus noch von der Struktur her verwandten Coproporphyrinogen-III-Oxidasen durchgeführt werden (Layer *et al.*, 2010). Die Sauerstoff-abhängige Coproporphyrinogen-III-Oxidase (CPO, kodiert von *hemF*) wurde vorwiegend bei Tieren und Pflanzen und nur vereinzelt in Bakterien gefunden. Die Sauerstoff-unabhängige Coproporphyrinogen-III-Oxidase (kodiert von *hemN*) hingegen, die ein [4Fe-4S] Cluster besitzt und S-Adenosyl-L-Methionin (SAM) als Cofaktor nutzt (Layer *et al.*, 2002), katalysiert die Reaktion in den meisten Bakterien (Heinemann *et al.*, 2008). Auch das in dem nächsten katalytischen Schritt involvierte Enzym, die Protoporphyrinogen-IX-Oxidase (PPO), existiert in Sauerstoff-abhängiger

(kodiert von *hemY*) und -unabhängiger (kodiert von *hemG*) Form und unterscheidet sich zusätzlich in der Art der Cofaktoren (FAD bzw. FMN). Die PPO oxidiert Protoporphyrinogen IX, wobei drei weitere Doppelbindungen gebildet werden und somit das vollständig durchkonjugierte Tetrapyrrol, Protoporphyrin IX, entsteht (Porra & Falk, 1964). Diese Verbindung ist der zweite Verzweigungspunkt der Tetrapyrrolbiosynthese (Abb. 7). Mit der Insertion von Fe^{2+} in Protoporphyrin IX durch die Ferrochelatase (kodiert durch *hemH*) findet der letzte Schritt der Hämbiosynthese statt und es entsteht Protohäm (Häm *b*) (Dailey *et al.*, 2000). Ausgehend von diesem Molekül können durch weitere Modifikationen andere Häm-Derivate (Häm *a*, *c* oder *d*) bzw. durch Linearisierung Biline hervorgehen. Mit der Insertion von Mg^{2+} in Protoporphyrin IX und durch weitere enzymatische Schritte werden Chlorophylle und Bakteriochlorophylle gebildet.

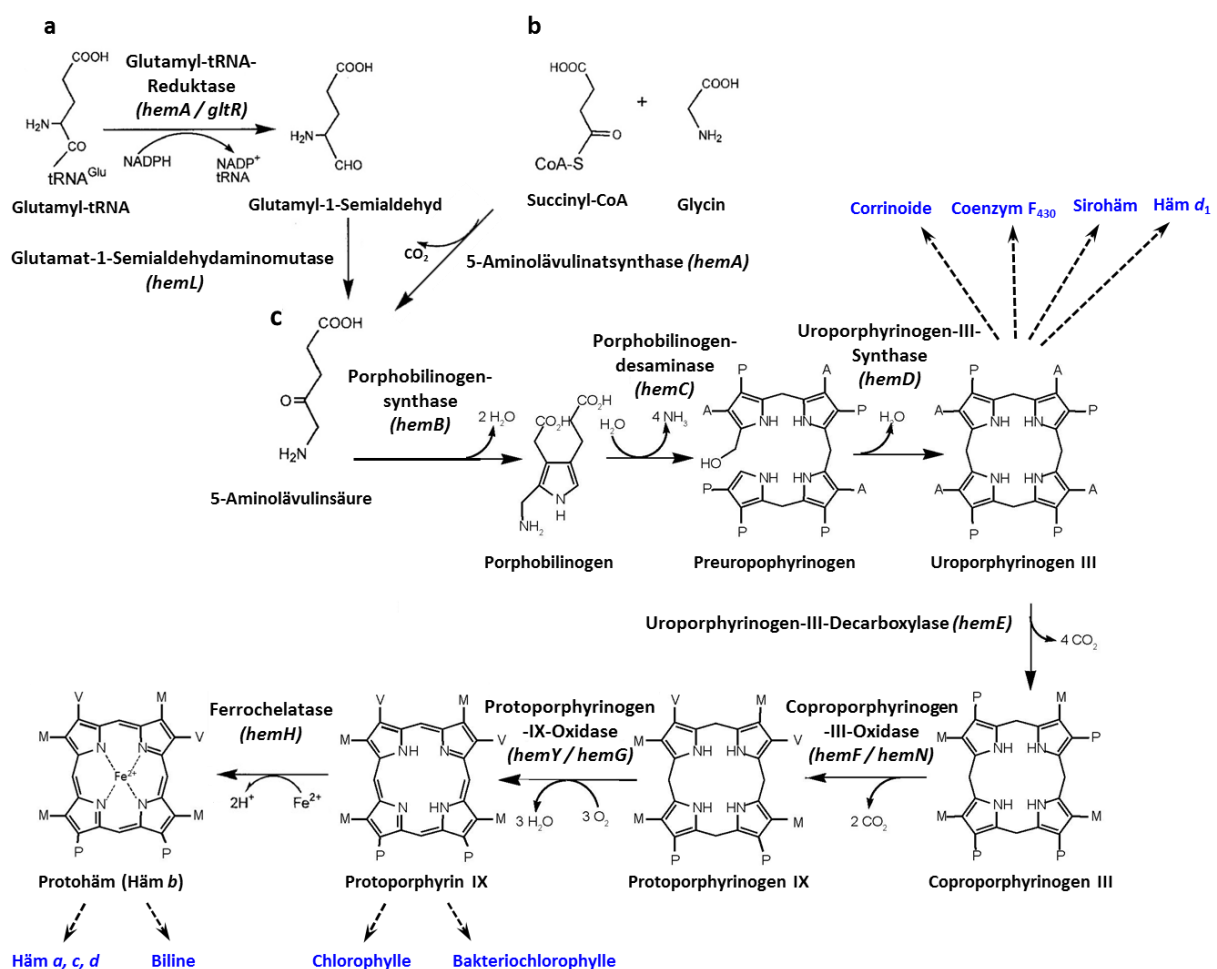


Abb. 7: Die Tetrapyrrolbiosynthese im Überblick (verändert nach Heinemann *et al.* (2008) und Panek & O'Brian (2002)).
 a) Bildung der 5-Aminolävulinat (ALA) über den C₅-Weg. b) Bildung der 5-Aminolävulinat (ALA) über den Shemin-Weg. c) Identischer Verlauf der Biosynthese aller Tetrapyrrole bis zu den Verzweigungspunkten Uroporphyrinogen III und Protoporphyrin IX. A (Acetylgruppe) = CH₃COOH, P (Propionylgruppe) = CH₂CH₂COOH, M (Methylgruppe) = CH₃, V (Vinylgruppe) = CH = CH₂.

1.4.2.1 Vom Porphobilinogen zum Uroporphyrinogen III im Detail

Eine der herausforderndsten Fragen bei der Aufklärung der Tetrapyrrolbiosynthese war, wie aus Porphobilinogen Uroporphyrinogen III entsteht. In den 1950er Jahren wurden mehr als zwanzig

verschiedene Mechanismen postuliert, von welchen jedoch die meisten wieder verworfen werden mussten (zusammengefasst in Battersby, 2000). Erst die Entdeckung von Bogorad und Granik, dass an der Reaktion nicht nur ein sondern zwei Enzyme beteiligt sind, brachte einen entscheidenden Fortschritt (Bogorad & Granick, 1953).

Heute ist bekannt, dass die Polyaddition der Porphobilinogenmoleküle zum Preuroporphyrinogen durch die Porphobilinogendesaminase (HemC) erfolgt und die darauffolgende Reaktion zum Uroporphyrinogen III durch die Uroporphyrinogen-III-Synthase (HemD) katalysiert wird (Abb. 8). Ist die Aktivität der Uroporphyrinogen-III-Synthase eingeschränkt, zyklisiert Preuroporphyrinogen spontan zum symmetrischen Uroporphyrinogen I (Jordan, 1991), welches in der Zelle akkumuliert und eine toxische Wirkung für die meisten Organismen hat (Battersby *et al.*, 1978; Crockett *et al.*, 1991; Dailey, 1990; Jahn *et al.*, 1996).

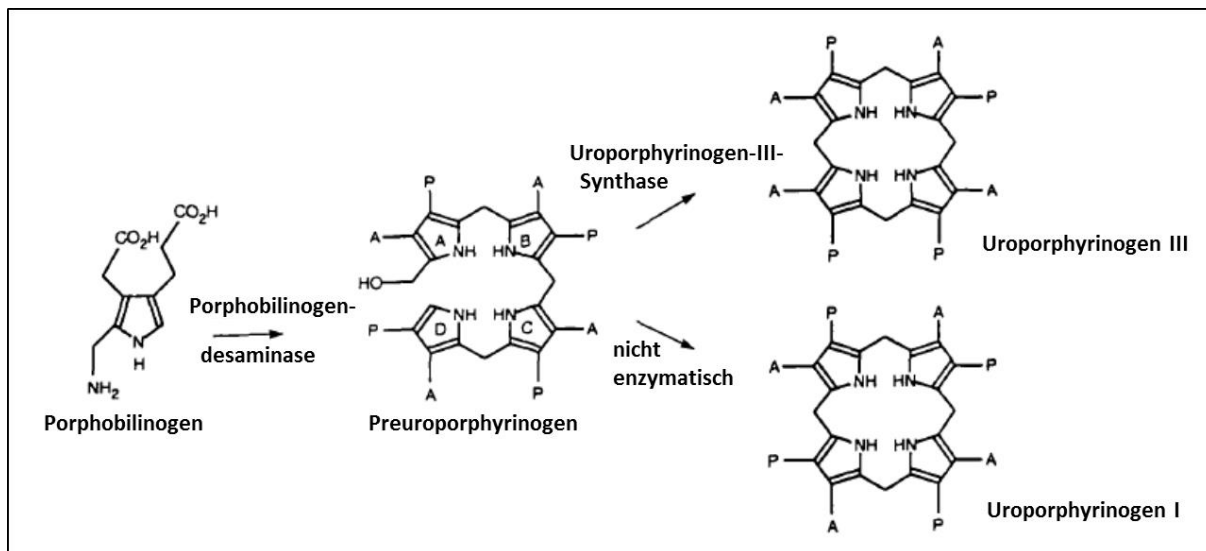


Abb. 8: Die Umwandlung von Porphobilinogen über Preuroporphyrinogen zu Uroporphyrinogen III bzw. I (verändert nach Shoolingin-Jordan (1995)). A (Acetylgruppe) = CH_2COOH , P (Propionylgruppe) = $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$.

1.4.2.1.1 Porphobilinogendesaminase (HemC)

Das Enzym Porphobilinogendesaminase (HemC, auch bekannt als Hydroxamethylbilan-Synthase oder Uroporphyrinogen-I-Synthase; EC 2.5.1.61) katalysiert den Schritt des Tetrapyrrolbiosynthesewegs, bei welchem vier Porphobilinogenmoleküle zu dem instabilen, offenkettigen Tetrapyrrol Preuroporphyrinogen verknüpft werden. Die Porphobilinogendesaminase wurde bereits aus verschiedenen Pro- und Eukaryonten, wie beispielsweise aus *Rhodospseudomonas spheroides* (Jordan & Shemin, 1973; Davies & Neuberger, 1973), *E. coli* (Hart *et al.*, 1986; Jordan *et al.*, 1988), *Euglena gracilis* (Williams *et al.*, 1981), Spinat (Higuchi & Bogorad, 1975), *A. thaliana* (Jones & Jordan, 1994) und menschlichen Erythrocyten (Anderson & Desnick, 1980) isoliert und charakterisiert. All diese Enzyme sind Monomer mit einer relativen molekularen Masse zwischen 34 000 und 44 000 (Jordan, 1991). Im Aminosäuresequenzvergleich zeigt sich, dass HemC hochkonserviert ist und somit die Proteine aus Bakterien, Pilzen, Pflanzen und Tieren eine Übereinstimmung von mindestens 32 %

aufweisen (Louie *et al.*, 1996). HemC aus *E. coli* war das erste Enzym des Tetrapyrrolbiosynthesewegs, dessen Struktur gelöst wurde. Es besteht aus drei α/β Domänen vergleichbarer Größe, die über flexible Linkerregionen verbunden sind (Louie *et al.*, 1992; Louie *et al.*, 1996). Die Domänen 1 und 2 bilden zusammen eine Spalte, in der sich das aktive Zentrum des Enzyms befindet. Topologisch ähneln diese Domänen einer Reihe von periplasmatischen Bindeproteinen (Louie, 1993). Die Domäne 3 befindet sich am Eingang dieser Spalte und trägt den für dieses Enzym charakteristische Dipyrrromethanocofaktor (DPM), welcher kovalent über eine Thioetherbrücke mit einem konservierten Cysteinrest verbunden ist (Jordan & Warren, 1987; Hart *et al.*, 1988).

Inzwischen konnten auch Strukturen des Proteins aus anderen Organismen wie *B. megaterium* (Azim *et al.*, 2013), *A. thaliana* (Roberts *et al.*, 2013) und aus dem Menschen (Gill *et al.*, 2009; Song *et al.*, 2009) gelöst werden. (Abb. 9). Im Wesentlichen sind sich die Strukturen sehr ähnlich. Die *E. coli* Struktur beispielsweise unterscheidet sich von der humanen lediglich in Schleifenregionen, die zusätzliche Aminosäureinsertionen aufweisen (Gill *et al.*, 2009).

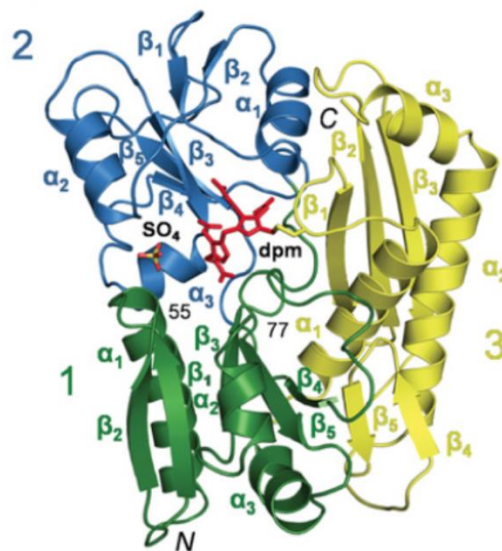


Abb. 9: Dreidimensionale Struktur der Porphobilinogen desaminase aus dem Menschen (Gill *et al.* (2009)). Die Domänen sind in verschiedenen Farben dargestellt: Domäne 1 (grün), Domäne 2 (blau), Domäne 3 (gelb). Der Dipyrrromethanocofaktor (dpm, rot) ist mit einem Cysteinrest der Domäne 3 verbunden und befindet sich am aktiven Zentrum zwischen Domäne 1 und 2.

Ungewöhnlicherweise wird der Dipyrrromethanocofaktor (DPM) vom Apoenzym selbst synthetisiert, indem entweder zwei Porphobilinogenmoleküle (PBG) verknüpft werden oder zwei bereits verknüpfte PBG-Moleküle vom Produkt Preuroporphyrinogen abgespalten werden (Awan *et al.*, 1997). An der korrekten Positionierung des Cofaktors und des zu addierenden PBG-Moleküls scheinen mehrere konservierte Argininreste beteiligt zu sein (Lander *et al.*, 1991). Bei der Tetrapolymerisationsreaktion dient der DPM als Primer für die sequenziellen Additionen der vier PBG-Moleküle, die in der Reihenfolge A bis D verknüpft werden (Jordan & Seehra, 1979; Battersby *et al.*,

1980) (Abb. 10). Die Verlängerung der Pyrrolkette erfolgt in drei sich wiederholenden Schritten. Zunächst wird das noch ungebundene PBG Molekül desaminiert, wobei ein hochkonservierter Aspartatrest von HemC eine wichtige Rolle spielt (Woodcock & Jordan, 1994; Shoolingin-Jordan *et al.*, 2003). Durch einen nukleophilen Angriff auf die freie α -Position des terminal gebundenen Pyrrolrings wird dann eine Kohlenstoff-Kohlenstoff-Brücke gebildet und anschließend das selbe Kohlenstoffatom deprotoniert. Da HemC nur über ein aktives Zentrum verfügt, wird vermutet, dass die PBG-Kette durch das Enzym „gezogen“ wird, was durch die Flexibilität der drei α/β Domänen des Enzyms ermöglicht werden könnte (Warren & Jordan, 1988; Louie *et al.*, 1992). Ist die Bildung des Hexapyrrols abgeschlossen, wird das lineare Tetrapyrrol Preuroporphyrinogen (1-Hydroxymethylbilan) freigesetzt, wobei der DPM unverändert kovalent gebunden am Enzym verbleibt. Es ist allerdings noch nicht vollständig geklärt, welche Faktoren das Kettenwachstum nach vier polymerisierten PBG Molekülen beenden.

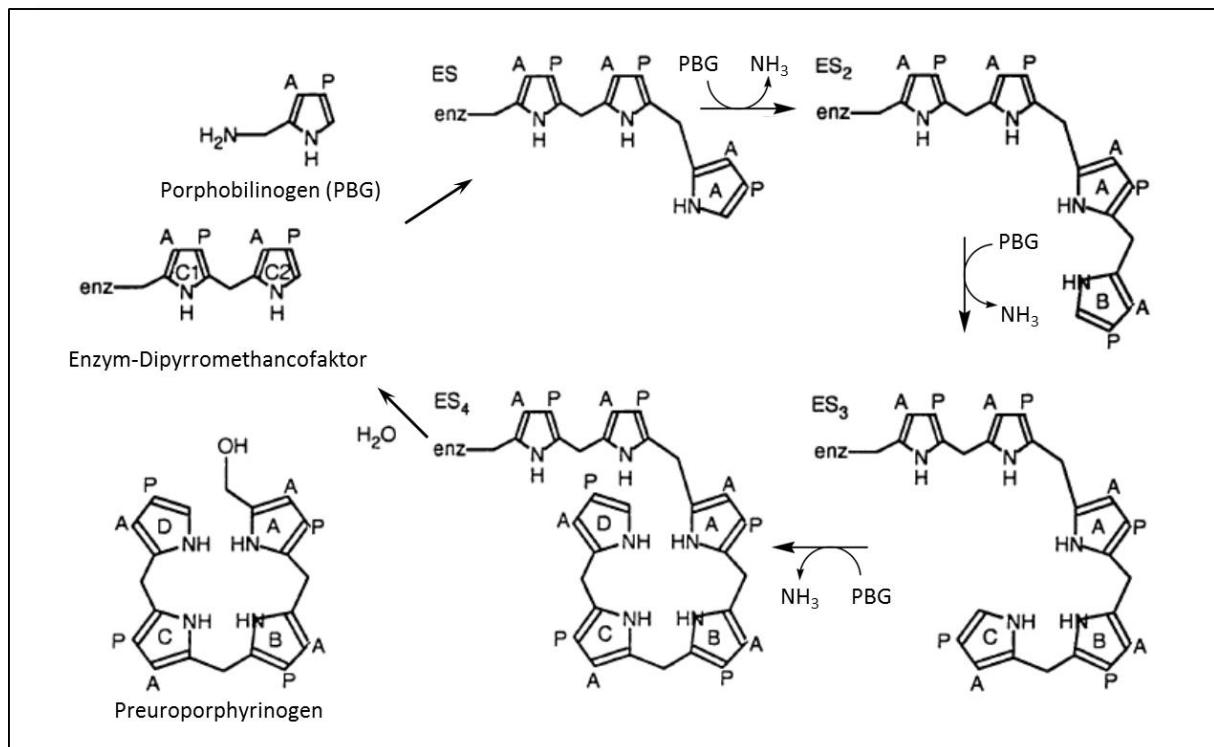


Abb. 10: Reaktionsmechanismus der Porphobilinogendesaminase (verändert nach Shoolingin-Jordan *et al.* (1996)). Nach der kovalenten Bindung des Dipyrromethanocofaktors an das Enzym findet unter Abspaltung von Ammoniak die sequentielle Polymerisation von weiteren Porphobilinogenmolekülen (A-D) statt. Dabei entstehen die Enzym-Substratkomplexe ES₁-ES₄. Im letzten Schritt wird schließlich das Produkt, Preuroporphyrinogen, abgespalten. A (Acetylgruppe) = CH₂COOH, P (Propionylgruppe) = CH₂CH₂COOH.

Mutationen in HemC, die zu einer verminderten Enzymaktivität führen, lösen beim Menschen „Akute intermittierende Porphyrie“ (AIP) aus. Diese Krankheit wird autosomal dominant vererbt und ist die häufigste der akuten Porphyrien (Wood *et al.*, 1995). Sie geht mit abdominalen Schmerzen, neurologischen Störungen und psychischen Veränderungen einher. Über den Urin werden vermehrt

Aminolävulinsäure und Porphobilinogen ausgeschieden, was einen diagnostischen Nachweis ermöglicht (Petrides, 1997).

1.4.2.1.2 Uroporphyrinogen-III-Synthase (HemD)

Die Reaktion der Uroporphyrinogen-III-Synthase (HemD oder Uroporphyrinogen-III-Cosynthase, EC 4.2.1.75) folgt derjenigen von HemC in der Tetrapyrrolbiosynthese und wird vom Gen *hemD* kodiert, welches bei Prokaryoten häufig downstream von *hemC* vorliegt (Jordan *et al.*, 1987; Panek & O'Brian, 2002). HemD katalysiert die Bildung des zyklischen Uroporphyrinogen III, welches einen Verzweigungspunkt in der Tetrapyrrolsynthese darstellt (Battersby & Leeper, 1990; Scott, 1993). Bei der Reaktion wird der Ringschluss des linearen Preuroporphyrinogens vermittelt, wobei der D-Ring des Tetrapyrrols gedreht wird (Battersby, 1978a; Battersby, 1978b; Pichon *et al.*, 1994b). Durch diese Drehung wird die Asymmetrie festgelegt, die ein Merkmal aller biologisch relevanten Porphyrine ist. HemD konnte aus verschiedenen Organismen wie beispielsweise aus Spinat (Higuchi & Bogorad, 1975), aus der Ratte (Kohashi *et al.*, 1984), *E. gracilis* (Hart & Battersby, 1985) und menschlichen Erythrozyten (Tsai *et al.*, 1987) gereinigt und charakterisiert werden. Das Protein ist ein Monomer mit einer relativen molekularen Masse von 26 000 bis 31 000 und hat eine 500-fach höhere Enzymaktivität als HemC, um die Umsetzung des Preuroporphyrinogens in Uroporphyrinogen III zu gewährleisten und so der spontane Zyklisierung zu Uroporphyrinogen I zuvorzukommen (Shoolingin-Jordan, 1995). Anders als HemC und die meisten an der Tetrapyrrolbiosynthese beteiligten Enzymen weist HemD aus unterschiedlichen Organismen nur eine geringe Sequenzhomologie auf. Humanes HemD besitzt beispielsweise nur eine 14 %-ige Ähnlichkeit zu HemD aus *Thermus thermophilus* (Schubert *et al.*, 2008). Diese Divergenz in der primären Sequenz macht die Identifikation entsprechender Gene, die Uroporphyrinogen-III-Synthase in verschiedenen Organismen kodieren, schwierig. So konnte das *hemD*-Gen aus *A. thaliana* nur durch funktionale Komplementation identifiziert werden (Tan *et al.*, 2008). Kristallstrukturen von humanem HemD (Mathews *et al.*, 2001), aus *T. thermophilus* (Schubert *et al.*, 2008) und *Pseudomonas syringae* und *aeruginosa* (Peng *et al.*, 2011; Moynie *et al.*, 2013) zeigen jedoch, dass sich die Uroporphyrinogen-III-Synthasen verschiedenen Ursprungs strukturell ähnlich sind. Sie bestehen aus zwei Domänen, die jeweils ein mehrsträngiges β -Faltblatt umgeben von α -Helices enthalten. Domänen 1 und 2 werden von einer β -Faltblatt-Struktur verbunden, die zwei antiparallele Stränge aufweist (Abb. 11).

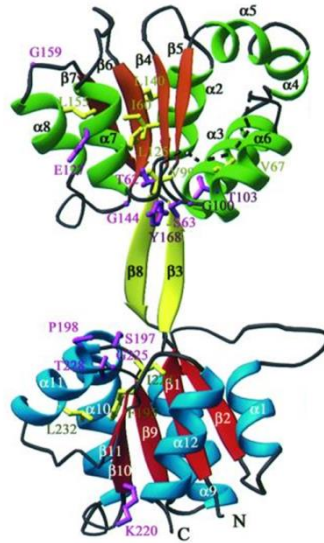


Abb. 11: Dreidimensionale Struktur der humanen Uroporphyrinogen-III-Synthase (Mathews *et al.* (2001)). Die Helices und Faltblätter der Domäne 1 sind blau und rot eingefärbt, während die der Domäne 2 grün und rot sind. Die Faltblätter, die beide Domänen verbinden, sind gelb dargestellt.

Aus den Strukturdaten ist bekannt, dass beide Domänen in der Position zueinander variieren (Mathews *et al.*, 2001; Schubert *et al.*, 2008; Peng *et al.*, 2011). Diese Flexibilität spielt vermutlich während der Katalyse eine wichtige Rolle (Mathews *et al.*, 2001). Das Produkt Uroporphyrinogen III wird über Wasserstoffbrücken, die sich zwischen Seitenketten des Produkts und der Hauptkette des Enzyms ausbilden, zwischen den beiden Domänen gehalten (Schubert *et al.*, 2008). Im aktiven Zentrum wurden nur wenige hochkonservierte Reste identifiziert. Mutationsanalysen ergaben, dass ein konservierter Tyrosinrest an der katalytischen Reaktion beteiligt ist (Mathews *et al.*, 2001; Roessner *et al.*, 2002; Schubert *et al.*, 2008; Peng *et al.*, 2011). Wie bereits 1961 von Mathewson und Corwin vorgeschlagen, nimmt man an, dass die Umwandlung vom Preuroporphyrinogen zum Uroporphyrinogen III über ein Spirointermediat verläuft (Mathewson & Corwin, 1961). Diese Hypothese wurde durch NMR Untersuchungen mit radioaktivmarkiertem Substrat, sowie durch Studien mit synthetischen Spirolactam-Derivaten, die als Inhibitor der Reaktion fungieren, gestützt (Stark *et al.*, 1986; Leeper, 1994; Pichon *et al.*, 1994a). Unter Abspaltung einer Hydroxylgruppe wird ein Azafulvenzwischenprodukt gebildet, welches in ein spirozyklisches Pyrrolenin übergeht. In diesem Zustand formen C16 und C20 des Tetrapyrrols eine kovalente Verbindung. Dann wird die Bindung zwischen Ring C und D aufgebrochen und es bildet sich erneut ein Azafulven, welches durch die Verknüpfung von C15 mit C19 schließlich in Uroporphyrinogen III überführt wird (Abb. 12).

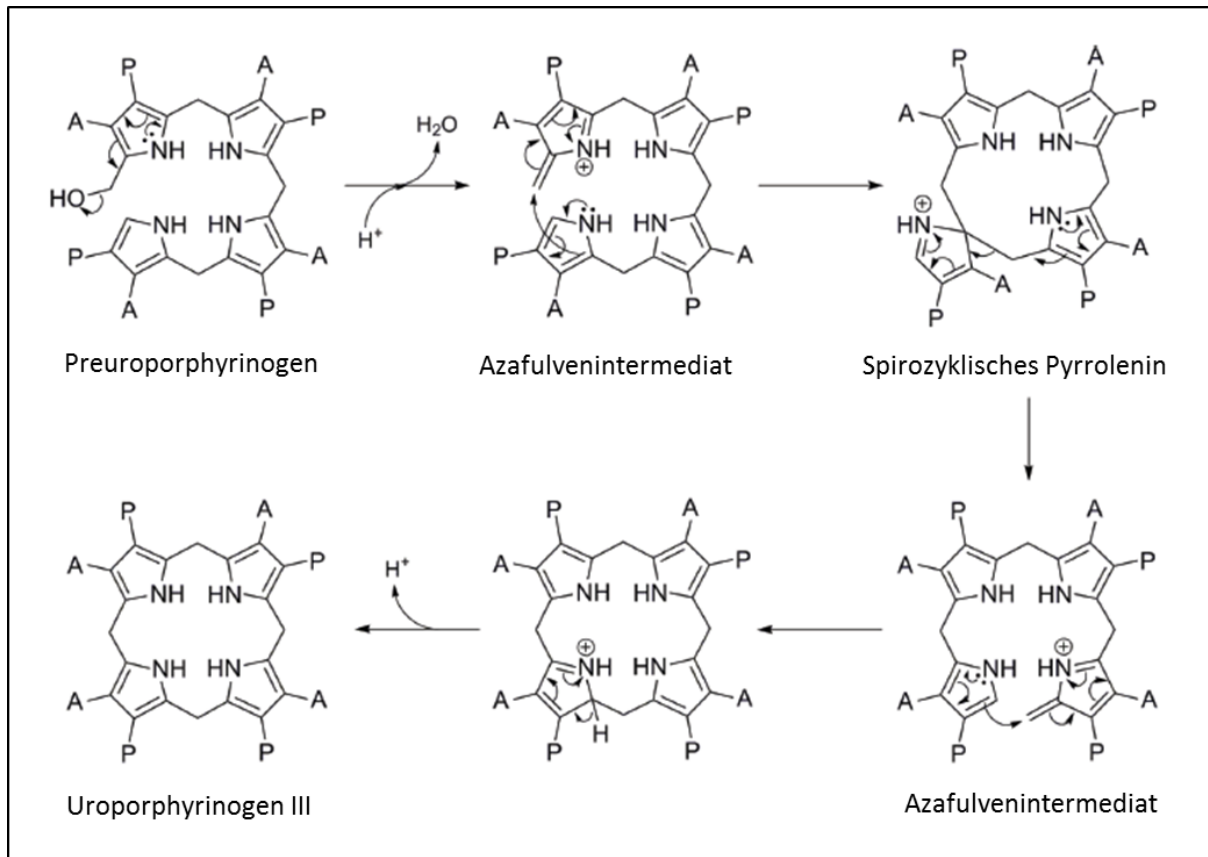


Abb. 12: Putativer Reaktionsmechanismus der Uroporphyrinogen-III-Synthase (verändert nach Layer *et al.* (2011)). HemD katalysiert die Umformung des linearen Preuroporphyrinogens über ein Spirointermediat in das asymmetrische Uroporphyrinogen III durch Zyklisierung des Tetrapyrrols und Drehung des D Rings (Mathewson & Corwin, 1961). A (Acetylgruppe) = CH_2COOH , P (Propionylgruppe) = $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$.

Mutationen in der Uroporphyrinogen-III-Synthase verursachen beim Menschen „Kongenitale erythropoetische Porphyrie“ (CEP), eine selten auftretende autosomal rezessive Krankheit. Aufgrund der verringerten HemD Aktivität zyklisiert das sehr labile Preuroporphyrinogen zu Uroporphyrinogen I. Dieses kann zwar teilweise von der Uroporphyrinogen-III-Decarboxylase noch zu Coproporphyrinogen I umgesetzt werden, was jedoch von den folgenden Enzymen der Tetrapyrrolbiosynthese nicht mehr umgesetzt wird. Daher sammeln sich die oxidierten Formen Uroporphyrin I und Coproporphyrin I im Plasma, im Gewebe und in den Erythrozyten an, was zu extremer Photosensibilität der Haut und hämolytischer Anämie führt (Tanigawa *et al.*, 1995; Ged *et al.*, 2009; Fortian *et al.*, 2011).

1.4.2.2 Substrat-Channeling während der Tetrapyrrolbiosynthese

Als Substrat-Channeling bezeichnet man den direkten Transfer eines Reaktionszwischenproduktes vom aktiven Zentrum eines Enzyms zum aktiven Zentrum eines anderen Enzyms, ohne dass das Zwischenprodukt dabei freigesetzt und in Kontakt mit der Umgebung kommt (Spivey & Ovadi, 1999; Miles *et al.*, 1999). Die Art der Übergabe kann sowohl innerhalb eines Enzymkomplexes, eines assoziierten Multienzymkomplex oder zwischen den Komponenten eines transienten

Enzymkomplexes erfolgen (Huang *et al.*, 2001). Im Gegensatz zur freien Diffusion kann durch die direkte Übergabe eine schnellere Translokation des Reaktionsintermediates stattfinden. Zudem kann eine Verdünnung des Reaktionsintermediates oder die Einschleusung in kompetierende Reaktionen umgangen werden. Außerdem werden so labile Intermediate geschützt bzw. toxische Zwischenprodukte festgehalten. Beispiele für Substrat-Channeling wurde bereits in einer Vielzahl biochemischer Synthesewege wie im Aminosäuremetabolismus (Pan *et al.*, 1997), in der Purin- und Pyrimidinbiosynthese (Rudolph & Stubbe, 1995) und der Glykolyse (Ovadi *et al.*, 1983) aufgezeigt. Allerdings fehlen in vielen Fällen direkte und gesicherte experimentelle Nachweise, was zum einen an der Fülle spekulativer Substrat-Channeling-Vorgänge liegt und zum anderen daran, dass die Beteiligung transienter Enzymkomplexe die experimentelle Bestätigung erschwert (Huang *et al.*, 2001).

Auch während der Tetrapyrrolbiosynthese gibt es instabile Zwischenprodukte wie beispielsweise das hoch reaktive Glutamat-1-Semialdehyd (GSA), welches anfällig für Autozyklisierung ist und Nebenreaktionen mit anderen Zellkomponenten oder der wässrigen Umgebung eingeht (Lüer *et al.*, 2005). Es entsteht bei der durch die Glutamyl-tRNA-Reduktase (GluTR) katalysierten Reduktion von Glutamyl-tRNA und wird dann von der Glutamat-1-Semialdehydaminomutase (GSAM) in 5-Aminolävulinsäure, dem gemeinsamen Vorläufer aller Tetrapyrrole, umgewandelt. Aufgrund ihrer Topologie legten die Strukturen der GluTR aus *Methanopyrus kandleri* und GSAM aus *Synechococcus* sp. nahe, dass sich eine Protein-Protein-Interaktion zwischen den Enzymen ausbildet und so GSA direkt transferiert werden kann (Hennig *et al.*, 1997; Moser *et al.*, 2001). Dies konnte durch biochemische Untersuchungen wie Co-Immunopräzipitation und Dichtegradientenultrazentrifugation der entsprechenden Enzyme aus *E. coli* und *Chlamydomonas reinhardtii* bestätigt werden (Lüer *et al.*, 2005; Nogaj & Beale, 2005). Auch die Vermutung, dass das vorletzte Enzym der Hämbiosynthese, die Protoporphyrinogen-IX-Oxidase, mit dem letzten, der Ferrochelatase, einen Komplex bildet, wurde zunächst durch *in silico* Modellierung der entsprechenden Kristallstrukturen gestützt (Ferreira *et al.*, 1988; Koch *et al.*, 2004). Bei dieser Modellierung ergab sich eine Überlappung der Kanalöffnungen beider Enzyme, durch die das chemisch reaktive Protoporphyrin IX direkt vom einen zum anderen aktiven Zentrum geschleust werden soll. Der experimentelle Nachweis der Protein-Protein-Interaktion gelang durch Co-Immunopräzipitation der rekombinant in *E. coli* produzierten Enzyme aus *Thermosynechococcus elongatus*. Ergänzend dazu konnte die Colokalisierung von Protoporphyrinogen-IX-Oxidase und Ferrochelatase in der *T. elongatus* Zelle durch elektronenmikroskopische Untersuchung festgestellt werden (Masoumi *et al.*, 2008).

Auch Preuroporphyrinogen ist mit einer Halbwertszeit von vier Minuten ein sehr instabiles Zwischenprodukt, welches in Kontakt mit der wässrigen Umgebung spontan zyklisiert (Jordan & Seehra, 1979). Es wird von HemC gebildet und anschließend von HemD weiter zu Uroporphyrinogen

III umgesetzt. Schon früh nahm man an, dass beide Enzyme in engem Zusammenspiel agieren, was HemD den Namen Uroporphyrinogen-III-Cosynthase einbrachte (Jahn *et al.*, 1996). Allerdings waren die ersten Hinweise, die durch Dichtegradientenzentrifugation erhalten wurden, nicht eindeutig (Higuchi & Bogorad, 1975). Batlle und Rosetti stützen die These, da sie unter Anwendung mehrerer Reinigungsschritte HemC und D zusammen reinigten (Batlle & Rossetti, 1977). Kinetische Studien konnten jedoch die Komplexbildung nicht bestätigen (Jordan & Dailey, 1990). Trotzdem wird nach wie vor vermutet, dass eine Interaktion zwischen den Enzymen stattfindet und so die Freisetzung von Preuroporphyrinogen vermieden wird, auch wenn dies bisher noch nicht experimentell gezeigt werden konnte (Jahn *et al.*, 1996; Frankenberg *et al.*, 2003; Heinemann *et al.*, 2008; Layer *et al.*, 2010).

2 Zielsetzung

Diese Arbeit zeichnet sich durch zwei stark unterschiedliche Fragenstellungen aus. Dabei ging es zum einen um die Verbesserung der rekombinanten Proteinproduktion in *B. megaterium*, zum anderen um Studien zur Interaktion zweier *B. megaterium* Enzyme aus der Tetrapyrrolbiosynthese.

B. megaterium ist ein alternativer Wirt für die Produktion rekombinanter Proteine, wobei durch gezielte Weiterentwicklungen Erträge im g/l-Bereich erzielt werden können. In der Vergangenheit wurde jedoch festgestellt, dass die Codonzusammensetzung der mRNA des Zielproteins die Translationseffizienz und damit den Proteinertrag stark beeinflussen kann. Lag der errechnete Codon Adaptation Index (CAI) des Zielgens unter 0,3, musste dieses zeit- und kostenintensiv an den Codongebrauch von *B. megaterium* adaptiert werden. Daher sollte in dieser Arbeit untersucht werden, wie sich der Ertrag eines rekombinanten Proteins durch die Coexpression von *tRNA*-Genen, deren Genprodukte seltene Codons bedienen, in *B. megaterium* steigern lässt. Dabei sollte zunächst ein bereits etabliertes GFP-Codontestsystem um die zu untersuchenden *tRNA*-Gene erweitert und deren Funktionalität sowie ihr Einfluss auf die produzierte GFP Menge untersucht werden. Darauf aufbauend sollte die Auswirkung der Coexpression der als funktionell bestätigten *tRNA*-Gene auf die Produktion von zwei weiteren Proteinen, der intrazellulären Formiatdehydrogenase aus *Mycobacterium vaccae* (FDH) und der extrazellulären Hydrolase aus *Thermobifida fusca* (TFH), analysiert werden. Zusätzlich sollte eine vergleichende Proteomanalyse durchgeführt werden, um Hinweise auf den generellen Einfluss coexprimierter *tRNA*-Gene zu erhalten.

In der Tetrapyrrolbiosynthese katalysiert die Porphobilinogen-desaminase (HemC) die sukzessive Addition von Porphobilinogen zum instabilen Preuroporphyrinogen, welches dann von der Uroporphyrinogen-III-Synthase (HemD) zu Uroporphyrinogen III umgesetzt wird. Man nimmt an, dass das Intermediat Preuroporphyrinogen direkt von HemC an HemD durch Bildung eines Protein-Komplexes weitergegeben wird, um eine spontane Zyklisierung des Preuroporphyrinogens zu vermeiden. Um dies zu analysieren sollte im zweiten Teil dieser Arbeit die Interaktion zwischen *B. megaterium* HemC und HemD über *in vivo* und *in vitro* Ansätze nachgewiesen werden. Als *in vivo* Methoden sollten das Bacterial Two-Hybrid (BACTH) System und erstmals in *B. megaterium* der Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) zum Einsatz kommen. Für beiden Methoden sollten Plasmide konstruiert und in den entsprechenden Organismen (*E. coli*, *B. megaterium*) eingesetzt werden, um so Hinweise zur Interaktion zwischen HemC und HemD unter zellspezifischen Bedingungen zu bekommen. Für die *in vitro* Analysen sollten beide Proteine rekombinant in *E. coli* produziert und gereinigt werden. Gegen die gereinigten Proteine HemC und HemD sollten Antikörper generiert werden, um diese in einer Co-Immunopräzipitation einzusetzen. Zudem sollten Co-Kristallisationsversuche und Pulldownexperimente durchgeführt werden.

3 Material und Methoden

3.1 Geräte und Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Geräte, Chemikalien, Kits, Enzyme und Hilfsmittel sind in Tabelle 2 und Tabelle 3 aufgelistet.

Tab. 2: Geräteliste.

Gerät	Modell/Zubehör	Hersteller
Agarosegelelektrophoresekammer	Agagel Mini	Biometra
Äkta Purifier System	Säule: HiLoad 16/60 Superdex 75	GE Healthcare
Anaerobenbox	MACS-MG-1000	Microbiology International
Autoklav	LVSA 50/70 LVSA	Zirbus
Blauschirm	Flu-O-blu	Biozym
Blotapparatur	Trans-Blot Turbo	Bio-Rad
Chemilumineszenz – Dokumentationsanlage	CoolSNAP HQ ²	Photometrix
Fluoreszenzspektrometer	LS50B TP8500	Perkin Elmer Jasco
Geldokumentationsanlage	DeVision DBox	Decon Science Tec
Kamera	CanonEOS 450D	Canon
Kippschüttler	MR1 MiniRocker	Kisker
Kugelmühle	FastPrep®-24 Homogenisator	MP Biomedical
Mikroskope	Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M Digital Microscope VHX 500F Stereomikroskop SZX9	Carl Zeiss AG Keyence Olympus
pH-Meter	CGH842	Schott
Photometer	Ultrospec 2000 Nanodrop ND-1000	GE Healthcare Peglab Biotechnology GmbH
Pipetten	Research Reference	Eppendorf
Reinstwasseranlage	Milli-Q System	Millipore
Rollentaumler	RM5	Ingenieurbüro CAT
Schüttler	TR-150	Infors AG
SDS-Gelelektrophoresekammer	Mini Protean III System	Bio-Rad
Thermocycler	T personal Thermocycler CFX96	Biometra Bio-Rad
Thermomixer	Thermomixer compact	Eppendorf
Ultraschallhomogenisator	Sonoplus UW2070 (Sonotrode MS72)	Bendelin
UV-Tisch	UV Transilluminator	Wealtec Europe
UV-Vis Spektrophotometer	V-550	Jasco
Waagen	SBA52 BP615	Scaltec Sartorius
Zentrifugen	Biofuge fresco Megafuge 1.0R Avanti J-30I (Rotor: JLA-9.1000) Avanti J-26 XP (Rotor: JLA- 8.100) Centrifuge Minispin	Heraeus (Thermo Scientific) Heraeus (Thermo Scientific) Beckman Coulter Beckman Coulter Eppendorf

Tab. 3: Liste der verwendeten Chemikalien, Kits, Enzyme und Hilfsmittel

Chemikalien/Kits/Enzyme/Hilfsmittel	Hersteller
5-Aminolävulinsäure	Sigma-Aldrich
Amersham ECL TM Prime Western Blotting Detection Reagent	GE Healthcare
Antibiotic Medium No. 3	Difco/Becton
Benzonase	Merck Millipore
Blotting Paper Sheets (Whatmanpaper)	Neolab
Casamminosäuren	Becton
Chelating Sepharose Fast Flow	GE Healthcare
Clean-Blot TM IP Detection Reagent	Thermo Scientific
Enzyme	New England BioLabs Fermentas GENECRAFT
Glaskugeln (ø 38 - 45 µm)	Worf GmbH
Größenstandard für Agarosegele GeneRuler TM DNA Ladder Mix	Fermentas
Größenstandard für SDS-Gele Unstained Protein Molecular weight marker PageRuler TM Prestained Protein Ladder	Fermentas Fermentas
Gummi arabicum	Fluka
IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid)	Gerbu
Nitrocellulosemembran	GE Healthcare
p-Nitrophenylpalmitat	Sigma-Aldrich
PEG-6000	Fluka
Pierce®Crosslink Magnetic IP/Co-IP Kit	Thermo Scientific
Proteaseinhibitormix	Roche
Porphobilinogen	Sigma-Aldrich
Screens Migas, Index EasyXtal® Pre-Screen Assay JCSG Core I-IV, Protein Complex	Hampton Research Qiagen Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
QIAquick Spin Miniprep Kit	Qiagen
Quick Ligation Kit	New England BioLabs
Roti-PVDF Transfer Membran	Merck Millipore
Xylose	Roth

Nicht explizit aufgeführte Chemikalien und Reagenzien wurden von Fluka, Difco, GE Healthcare, Merck Millipore, Riedel-de-Häen, Roth, Sigma-Aldrich, Fermentas, SERVA und AppliChem bezogen.

3.2 Bakterienstämme und Plasmide

Alle in dieser Arbeit eingesetzten Bakterienstämme und Plasmide sind in Tabelle 4 und Tabelle 5 aufgeführt.

Tab. 4: Verwendete Bakterienstämme.

Name	Beschreibung	Herkunft
<i>E. coli</i> Stämme		
DH10B TM	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) φ80d <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ <i>lacX74</i> <i>deoR</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>araD139</i> Δ(<i>ara, leu</i>)7697 <i>galU</i> <i>galk</i> λ ⁻ <i>rpsL</i> <i>nupG</i>	Gibco Life Technologies
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) Star TM -pLysS	F ⁻ <i>ompT</i> <i>hsdSB</i> (<i>r_B⁻m_B⁻</i>) <i>gal</i> <i>dcm</i> <i>rne131</i> (DE3) pLysS (Cam ^R)	Invitrogen
BTH101	F ⁻ , <i>cya-99</i> , <i>araD139</i> , <i>galE15</i> , <i>galk16</i> , <i>rpsL1</i> (Str ^r), <i>hsdR2</i> , <i>mcrA1</i> , <i>mcrB1</i>	Euromedex
<i>B. megaterium</i> Stämme		
DSM319	Wildtyp	DSMZ, Braunschweig
MS941	Mutante von DSM319, Δ <i>nprM</i>	Wittchen & Meinhardt, 1995
DSM509	Wildtyp	DSMZ, Braunschweig

Tab. 5: Verwendete Plasmide.

Name	Beschreibung	Herkunft
pMM1522	Shuttlevektor für Xylose-induzierbare Expression von rekombinanten Genen. P _{xyIA} -mcs-stop	Malten <i>et al.</i> , 2006
tRNA Coexpressionsvektoren (alle Vektoren basieren auf pMM1522 (Malten <i>et al.</i>, 2006))		
pGFP(GCC) pMGBm72	Shuttlevektoren zur Expression von <i>gfp</i> , welches am 5'-Terminus eine Insertion von 4 identischen Codons (GCC bzw. GCU (Alanin), CGG bzw. CGU (Arginin), ACC bzw. ACU (Threonin), UCC bzw. UCA (Serin)) aufweist und dessen Expression unter der Kontrolle des nativen Xylose-induzierbaren Promotors (P _{xyIA}) steht.	Gamer, 2009
pGFP(GCU) pMGBm73		
pGFP(CGG) pMGBm63		
pGFP(CGU) pMGBm64		
pGFP(ACC) pMGBm96		
pGFP(ACA) pMGBm97		
pGFP(UCC) pMGBm68		
pGFP(UCA) pMGBm67		
Shuttlevektoren zur Expression von <i>gfp</i> mit 5'-terminaler Insertion und Coexpression einzelner tRNA-Gene		
pGFP(GCC)_Ala_1 (pRBBm108)	tRNA ^{Ala} _{GCC} -Gen aus <i>B. megaterium</i> DSM319 mit	Diese Arbeit

Name	Beschreibung	Herkunft
pGFP(GCU)_Ala_1 (pCFBm4)	putativem nativen Promotor und Terminator über AflII in pGFP(GCC) bzw. pGFP(GCU)	
pGFP(GCC)_Ala_2 (pCFBm7)	<i>tRNA</i> ^{Ala} _{GCC} -Gen aus <i>B. megaterium</i> DSM319 mit putativem nativen Promotor und Terminator über EagI und NaeI in pGFP(GCC) bzw. pGFP(GCU)	Diese Arbeit
pGFP(GCU)_Ala_2 (pCFBm8)		
pGFP(CGG)_Arg_1 (pCFBm9)	<i>tRNA</i> ^{Arg} _{CGG} -Gen aus <i>B. megaterium</i> DSM319 mit putativem nativen Promotor und Terminator über AflII in pGFP(CGG) bzw. pGFP(CGU)	Diese Arbeit
pGFP(CGU)_Arg_1 (pRBBm107)		
pGFP(CGG)_Arg_2 (pCFBm10)	<i>tRNA</i> ^{Arg} _{CGG} -Gen aus <i>B. megaterium</i> DSM319 mit putativem nativen Promotor und Terminator über EagI und NaeI in pGFP(CGG) bzw. pGFP(CGU)	Diese Arbeit
pGFP(CGU)_Arg_2 (pCFBm11)		
pGFP(ACC)_Thr (pCFBm46e)	<i>tRNA</i> ^{Thr} _{ACC} -Gen aus <i>B. megaterium</i> DSM319 mit putativem nativen Promotor und Terminator über AatII in pGFP(ACC) bzw. pGFP(ACA) (gleiche Orientierung wie <i>tet</i> ^R -Gen)	Diese Arbeit
pGFP(ACA)_Thr (pCFBm47)		Klunkelfuß, 2013
pGFP(ACC)_Thr_rv (pCFBm46f)	<i>tRNA</i> ^{Thr} _{ACC} -Gen aus <i>B. megaterium</i> DSM319 mit putativem nativen Promotor und Terminator über AatII in pGFP(ACC) bzw. pGFP(ACA) (Orientierung entgegen <i>tet</i> ^R -Gen)	Klunkelfuß, 2013
pGFP(ACA)_Thr_rv (pCFBm47f)		
pGFP(UCC)_Ser (pCFBm13)	<i>tRNA</i> ^{Ser} _{UCC} -Gen aus <i>B. megaterium</i> DSM319 mit putativem nativen Promotor und Terminator über AatII in pGFP(ACC) bzw. pGFP(ACA)	Diese Arbeit
pGFP(UCA)_Ser (pCFBm12)		
Kontrollvektoren für Expression von <i>tRNA</i> -Genen (ohne weiteres Testgen)		
pControl_Ala_Arg (pCFBm35)	Shuttlevektor für Coexpression des <i>tRNA</i> ^{Ala} _{GCC} - und <i>tRNA</i> ^{Arg} _{CGG} -Gens; pCFBm34 geschnitten mit BsrGI und EagI, gebluntet und religiert	Diese Arbeit
pControl_Ala_Arg_Thr (pCFBm40)	Shuttlevektor für Coexpression des <i>tRNA</i> ^{Ala} _{GCC} -, des <i>tRNA</i> ^{Arg} _{CGG} - und des <i>tRNA</i> ^{Thr} _{ACC} -Gens; <i>tRNA</i> ^{Thr} _{ACC} -Gen aus <i>B. megaterium</i> DSM319 mit putativem nativen Promotor und Terminator über AatII in pCFBm35	Diese Arbeit
Shuttlevektoren für Expression von Testgenen ohne und mit <i>tRNA</i> Coexpression		
pCBBm1	Shuttlevektor zur Coexpression des nativen <i>fdh</i> -Gens aus <i>Mycobacterium vaccae</i> und des <i>mdh</i> -Gens aus <i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	Bäumchen <i>et al.</i> , 2007
pFDH.opti (pARBm3)	Shuttlevektor für Xylose-induzierbare Expression des codonoptimierten <i>fdh</i> -Gens aus <i>M. vaccae</i> , P _{xyIA} - <i>fdh.opti</i>	Bäumchen <i>et al.</i> , 2007
pTFH.nat (pYYBm1)	Shuttelvektor für Xylose-induzierbare Expression des nativen <i>tfh</i> -Gens aus <i>Thermobifida fusca</i> , P _{xyIA} - <i>tfh.nat</i>	Yang <i>et al.</i> , 2007
pTFH.opti (pYYBm9)	Shuttelvektor für Xylose-induzierbare Expression des codonoptimierten <i>tfh</i> -Gens aus <i>Thermobifida fusca</i> , P _{xyIA} - <i>tfh.opti</i>	Yang <i>et al.</i> , 2007
pTFH.nat_Ala (pCFBm23)	Shuttlevektor zur Coexpression des nativen <i>tfh</i> -Gens aus <i>T. fusca</i> und des <i>tRNA</i> ^{Ala} _{GCC} -Gens; <i>gfp</i> gegen natives <i>tfh</i> -Gen über BsrGI und EagI in pCFBm7 ausgetauscht, P _{xyIA} - <i>tfh.nat</i>	Diese Arbeit

Name	Beschreibung	Herkunft
pTFH.opti_Ala (pCFBm22)	Shuttlevektor zur Coexpression des codonoptimierten <i>tfh</i> -Gens aus <i>T. fusca</i> und des $tRNA_{GCC}^{Ala}$ -Gens; <i>gfp</i> gegen codonoptimiertes <i>tfh</i> -Gen über BsrGI und EagI in pCFBm8 ausgetauscht, P_{xyIA} - <i>tfh.opti</i>	Diese Arbeit
pTFH.nat_Arg (pCFBm17)	Shuttlevektor zur Coexpression des nativen <i>tfh</i> -Gens aus <i>T. fusca</i> und des $tRNA_{CGG}^{Arg}$ -Gens; <i>gfp</i> gegen natives <i>tfh</i> -Gen über BsrGI und EagI in pCFBm9 ausgetauscht, P_{xyIA} - <i>tfh.nat</i>	Diese Arbeit
pTFH.opti_Arg (pCFBm16)	Shuttlevektor zur Coexpression des codonoptimierten <i>tfh</i> -Gens aus <i>T. fusca</i> und des $tRNA_{CGG}^{Arg}$ -Gens; <i>gfp</i> gegen codonoptimiertes <i>tfh</i> -Gen über BsrGI und EagI in pRBBm107 ausgetauscht, P_{xyIA} - <i>tfh.opti</i>	Diese Arbeit
pTFH.nat_Thr (pCFBm56)	Shuttlevektor zur Coexpression des nativen <i>tfh</i> -Gens aus <i>T. fusca</i> und des $tRNA_{ACC}^{Thr}$ -Gens; <i>gfp</i> gegen natives <i>tfh</i> -Gen über BsrGI und EagI in pCFBm47 ausgetauscht, P_{xyIA} - <i>tfh.nat</i>	Diese Arbeit
pTFH.opti_Thr (pCFBm57)	Shuttlevektor zur Coexpression des codonoptimierten <i>tfh</i> -Gens aus <i>T. fusca</i> und des $tRNA_{ACC}^{Thr}$ -Gens; <i>gfp</i> gegen codonoptimiertes <i>tfh</i> -Gen über BsrGI und EagI in pCFBm47 ausgetauscht, P_{xyIA} - <i>tfh.opti</i>	Diese Arbeit
pTFH.nat_Ala_Arg (pCFBm31)	Shuttlevektor zur Coexpression des nativen <i>tfh</i> -Gens aus <i>T. fusca</i> , des $tRNA_{GCC}^{Ala}$ - und des $tRNA_{CGG}^{Arg}$ -Gens; $tRNA_{CGG}^{Arg}$ enthaltendes Fragment aus pCFBm17 über BsrGI und AatII ausgeschnitten und in pCFBm23	Diese Arbeit
pTFH.opti_Ala_Arg (pCFBm32)	Shuttlevektor zur Coexpression des codonoptimierten <i>tfh</i> -Gens aus <i>T. fusca</i> , des $tRNA_{GCC}^{Ala}$ - und des $tRNA_{CGG}^{Arg}$ -Gens. $tRNA_{CGG}^{Arg}$ enthaltendes Fragment aus pCFBm17 über BsrGI und AatII ausgeschnitten und in pCFBm22	Diese Arbeit
pTFH.nat_Ala_Arg_Thr (pCFBm36)	Shuttlevektor zur Coexpression des nativen <i>tfh</i> -Gens aus <i>T. fusca</i> , des $tRNA_{GCC}^{Ala}$ -, des $tRNA_{CGG}^{Arg}$ - und des $tRNA_{ACC}^{Thr}$ -Gens; $tRNA_{ACC}^{Thr}$ -Gen aus <i>B. megaterium</i> DSM319 mit putativem nativen Promotor und Terminator über AatII in pCFBm31 (gleiche Orientierung wie <i>tet^R</i> -Gen)	Klunkelfuß, 2013
pTFH.opti_Ala_Arg_Thr (pCFBm37)	Shuttlevektor zur Coexpression des codonoptimierten <i>tfh</i> -Gens aus <i>T. fusca</i> , des $tRNA_{GCC}^{Ala}$ -, des $tRNA_{CGG}^{Arg}$ - und des $tRNA_{ACC}^{Thr}$ -Gens; $tRNA_{ACC}^{Thr}$ -Gen aus <i>B. megaterium</i> DSM319 mit putativem nativen Promotor und Terminator über AatII in pCFBm32 (gleiche Orientierung wie <i>tet^R</i> -Gen)	Klunkelfuß, 2013
pFDH.nat (pCFBm26)	Shuttlevektor zur Expression des nativen <i>fdh</i> -Gens aus <i>M. vaccae</i> ; natives <i>fdh</i> -Gen über BsrGI und NotI in pMM1522, P_{xyIA} - <i>fdh.nat</i>	Diese Arbeit
pFDH.nat_Ala (pCFBm24)	Shuttlevektor zur Coexpression des nativen <i>fdh</i> -Gens aus <i>M. vaccae</i> und des $tRNA_{GCC}^{Ala}$ -Gens; <i>gfp</i> gegen natives <i>fdh</i> -Gen über BsrGI und NotI in pCFBm7 ausgetauscht, P_{xyIA} - <i>fdh.opti</i>	Diese Arbeit

Name	Beschreibung	Herkunft
pFDH.opti_Ala (pCFBm25)	Shuttlevektor zur Coexpression des codonoptimierten <i>fdh</i> -Gens aus <i>M. vaccae</i> und des <i>tRNA</i> ^{Ala} _{GCC} -Gens; <i>gfp</i> gegen codonoptimiertes <i>fdh</i> -Gen über BsrGI und EagI in pCFBm8 ausgetauscht, P _{xyIA} - <i>fdh.opti</i>	Diese Arbeit
pFDH.nat_Arg (pCFBm27)	Shuttlevektor zur Coexpression des nativen <i>fdh</i> -Gens aus <i>M. vaccae</i> und des <i>tRNA</i> ^{Arg} _{CGG} -Gens; <i>gfp</i> gegen natives <i>fdh</i> -Gen über BsrGI und NotI in pCFBm9 ausgetauscht, P _{xyIA} - <i>fdh.nat</i>	Diese Arbeit
pFDH.opti_Arg (pCFBm28)	Shuttlevektor zur Coexpression des codonoptimierten <i>fdh</i> -Gens aus <i>M. vaccae</i> und des <i>tRNA</i> ^{Arg} _{CGG} -Gens; <i>gfp</i> gegen codonoptimiertes <i>fdh</i> -Gen über BsrGI und EagI in pRBBm107 ausgetauscht, P _{xyIA} - <i>fdh.opti</i>	Diese Arbeit
pFDH.nat_Thr (pCFBm54)	Shuttlevektor zur Coexpression des nativen <i>fdh</i> -Gens aus <i>M. vaccae</i> und des <i>tRNA</i> ^{Thr} _{ACC} -Gens; <i>gfp</i> gegen natives <i>fdh</i> -Gen über BsrGI und NotI in pCFBm47 ausgetauscht, P _{xyIA} - <i>fdh.nat</i>	Diese Arbeit
pFDH.opti_Thr (pCFBm55)	Shuttlevektor zur Coexpression des codonoptimierten <i>fdh</i> -Gens aus <i>M. vaccae</i> und des <i>tRNA</i> ^{Thr} _{ACC} -Gens; <i>gfp</i> gegen codonoptimiertes <i>fdh</i> -Gen über BsrGI und EagI in pCFBm47 ausgetauscht, P _{xyIA} - <i>fdh.opti</i>	Diese Arbeit
pFDH.nat_Ala_Arg (pCFBm33)	Shuttlevektor zur Coexpression des nativen <i>fdh</i> -Gens aus <i>M. vaccae</i> , des <i>tRNA</i> ^{Ala} _{GCC} - und des <i>tRNA</i> ^{Arg} _{CGG} -Gens; <i>tRNA</i> ^{Arg} _{CGG} enthaltendes Fragment aus pCFBm17 über BsrGI und AatII ausgeschnitten und in pCFBm24	Diese Arbeit
pFDH.opti_Ala_Arg (pCFBm34)	Shuttlevektor zur Coexpression des codonoptimierten <i>fdh</i> -Gens aus <i>M. vaccae</i> , des <i>tRNA</i> ^{Ala} _{GCC} - und des <i>tRNA</i> ^{Arg} _{CGG} -Gens; <i>tRNA</i> ^{Arg} _{CGG} enthaltendes Fragment aus pCFBm17 über BsrGI und AatII ausgeschnitten und in pCFBm25	Diese Arbeit
pFDH.nat_Ala_Arg_Thr (pCFBm38f)	Shuttlevektor zur Coexpression des nativen <i>fdh</i> -Gens aus <i>M. vaccae</i> , des <i>tRNA</i> ^{Ala} _{GCC} -, des <i>tRNA</i> ^{Arg} _{CGG} - und des <i>tRNA</i> ^{Thr} _{ACC} -Gens; <i>tRNA</i> ^{Thr} _{ACC} -Gen aus <i>B. megaterium</i> DSM319 mit putativem nativen Promotor und Terminator über AatII in pCFBm33 (Orientierung entgegen <i>tet</i> ^R -Gen)	Klunkelfuß, 2013
pFDH.opti_Ala_Arg_Thr (pCFBm39)	Shuttlevektor zur Coexpression des codonoptimierten <i>fdh</i> -Gens aus <i>M. vaccae</i> , des <i>tRNA</i> ^{Ala} _{GCC} -, des <i>tRNA</i> ^{Arg} _{CGG} - und des <i>tRNA</i> ^{Thr} _{ACC} -Gens; <i>tRNA</i> ^{Thr} _{ACC} -Gen aus <i>B. megaterium</i> DSM319 mit putativem nativen Promotor und Terminator über AatII in pCFBm34 (gleiche Orientierung wie <i>tet</i> ^R -Gen)	Klunkelfuß, 2013
Vektoren zur Analyse der HemC-HemD-Interaktion		
pSD1	<i>E. coli</i> Vektor basierend auf pET-14b für die IPTG-induzierbare Expression von <i>his-hemC</i> aus <i>B. megaterium</i> DSM509	E. Deery, persönliche Gabe
pSD2	<i>E. coli</i> Vektor basierend auf pET-14b für die IPTG-induzierbare Expression von <i>his-hemD</i> aus <i>B. megaterium</i> DSM509	E. Deery, persönliche Gabe

Name	Beschreibung	Herkunft
<i>E. coli</i> Vektoren für den Bacterial Two-Hybrid Assay		
pUT18	Vektor basierend auf dem high copy Plasmid pUC19, der das T18 Fragment der Adenylatcyclase unter Kontrolle von P_{lac} kodiert; mcs upstream von <i>t18</i>	Euromedex
pUT18C	Vektor basierend auf dem high copy Plasmid pUC19, der das T18 Fragment der Adenylatcyclase unter Kontrolle von P_{lac} kodiert; mcs downstream von <i>t18</i>	Euromedex
pUT18C-zip	Positivkontrolle: pUT18C Derivat für die Expression des Fusionsgens <i>t18-leucin-zipper</i> (Fusion mit heterologem Gen ist 3'-terminal)	Euromedex
pKT25	Vektor basierend auf dem low copy Plasmid pSU40, der das T25 Fragment der Adenylatcyclase unter Kontrolle des P_{lac} kodiert; mcs downstream von <i>t25</i>	Euromedex
pKNT25	Vektor basierend auf dem low copy Plasmid pSU40, der das T25 Fragment der Adenylatcyclase unter Kontrolle von P_{lac} kodiert; mcs upstream von <i>t25</i>	Euromedex
pKT25-zip	Positivkontrolle: pKT25 Derivat für die Expression des Fusionsgens <i>t25-leucin-zipper</i> (Fusion mit heterologem Gen ist 3'-terminal)	Euromedex
pUT18hemC	pUT18 Derivat für die IPTG-induzierbare Expression des Fusionsgens <i>hemC-t18</i> ; <i>hemC</i> -Gen aus <i>B. megaterium</i> DSM509 5'-terminal über XbaI und KpnI mit <i>t18</i> fusioniert	Suwandhi, 2012
pUT18ChemC	pUT18C Derivat für die IPTG-induzierbare Expression des Fusionsgens <i>t18-hemC</i> ; <i>hemC</i> -Gen aus <i>B. megaterium</i> DSM509 3'-terminal über XbaI und KpnI mit <i>t18</i> fusioniert	Suwandhi, 2012
pKT25hemC	pKT25 Derivat für die IPTG-induzierbare Expression des Fusionsgens <i>hemC-t25</i> ; <i>hemC</i> -Gen aus <i>B. megaterium</i> DSM509 3'-terminal über XbaI und KpnI mit <i>t25</i> fusioniert	Suwandhi, 2012
pKNT25hemC	pKNT25 Derivat für die IPTG-induzierbare Expression des Fusionsgens <i>t25-hemC</i> ; <i>hemC</i> -Gen aus <i>B. megaterium</i> DSM509 5'-terminal über XbaI und KpnI mit <i>t25</i> fusioniert	Suwandhi, 2012
pUT18hemD	pUT18 Derivat für die IPTG-induzierbare Expression des Fusionsgens <i>hemD-t18</i> . Das <i>hemD</i> -Gen aus <i>B. megaterium</i> DSM509 wurde 5'-terminal über XbaI und KpnI mit <i>t18</i> fusioniert.	Suwandhi, 2012
pUT18ChemD	pUT18C Derivat für die IPTG-induzierbare Expression des Fusionsgens <i>t18-hemD</i> ; <i>hemD</i> -Gen aus <i>B. megaterium</i> DSM509 3'-terminal über XbaI und KpnI mit <i>t18</i> fusioniert	Suwandhi, 2012
pKT25hemD	pKT25 Derivat für die IPTG-induzierbare Expression des Fusionsgens <i>hemD-t25</i> ; <i>hemD</i> -Gen aus <i>B. megaterium</i> DSM509 3'-terminal über XbaI und KpnI mit <i>t25</i> fusioniert	Suwandhi, 2012

Name	Beschreibung	Herkunft
pKNT25hemD	pKNT25 Derivat für die IPTG-induzierbare Expression des Fusionsgens <i>t25-hemD</i> ; <i>hemD</i> -Gen aus <i>B. megaterium</i> DSM509 5'-terminal über XbaI und KpnI mit <i>t25</i> fusioniert	Suwandhi, 2012
<i>E. coli</i> Vektoren für den Pulldown-Assay		
pETDuet-1	Vektor für die simultane und äquivalente Expression zweier Gene jeweils unter der Kontrolle eines T ₇ - Promotors	Novagen
pETDuet- <i>hishemC</i> (pCFEc1)	Vektor für die IPTG induzierbare Expression von <i>his-hemC</i> ; <i>hemC</i> aus <i>B. megaterium</i> DSM509 über BamHI und NotI in pETDuet-1	Diese Arbeit
pETDuet- <i>hemD</i> (pCFEc2)	Vektor für die IPTG induzierbare Expression von <i>hemD</i> ; <i>hemD</i> aus <i>B. megaterium</i> DSM509 über BglII und XhoI in pETDuet-1	Diese Arbeit
pETDuet- <i>hishemC-hemD</i> (pCFEc3)	Vektor für die IPTG induzierbare Coexpression von <i>his-hemC</i> und <i>hemD</i> ; <i>hemD</i> aus <i>B. megaterium</i> DSM509 über BglII und XhoI in pCFEc1	Diese Arbeit
Shuttlevektoren für Förster-Resonanzenergietransfer Analysen		
p3Stop1623hp	Shuttlevektor für rekombinante Genexpression in <i>B. megaterium</i> P _{xyIA} ^{opt.} -mcs-3stop).	Stammen <i>et al.</i> , 2010
pJKHBm4	Shuttlevektor für die Coexpression von <i>iyfp-hemC</i> _{DSM319} und <i>icfp-hemD</i> _{DSM319} unter Kontrolle des optimierten Xylose-induzierbaren Promotors; P _{xyIA} ^{opt.} - <i>iyfp-hemC-icfp-hemD</i>	Keller-Hüschemenger, 2012
<i>piyfphemC</i> (pCFBm48)	Shuttlevektor für die Expression von <i>iyfp-hemC</i> _{DSM319} unter Kontrolle von P _{xyIA} ^{opt.} ; <i>icfp-hemD</i> _{DSM319} aus pJKHBm4 über SacI und SphI geschnitten und religiert	Diese Arbeit
<i>piyfpicfp</i> (pCFBm49)	Positivkontrolle: Shuttlevektor für die Expression von <i>iyfp-icfp</i> unter Kontrolle von P _{xyIA} ^{opt.} ; <i>hemC</i> _{DSM319} und <i>icfp-hemD</i> _{DSM319} über BglII und SphI gegen <i>icfp</i> in pJKHBm4 ausgetauscht	Diese Arbeit
<i>piyfphemC-icfp</i> (pCFBm50)	Negativkontrolle: Shuttlevektor für die Coexpression von <i>iyfp-hemC</i> _{DSM319} und <i>icfp</i> unter Kontrolle von P _{xyIA} ^{opt.} ; <i>hemD</i> _{DSM319} über BamHI und SphI aus pJKHBm4 geschnitten und religiert	Diese Arbeit
<i>piyfp-icfp-hemD</i> (pCFBm51)	Negativkontrolle: Shuttlevektor für die Coexpression von <i>iyfp</i> und <i>icfp-hemD</i> _{DSM319} unter unter Kontrolle von P _{xyIA} ^{opt.} ; <i>iyfp</i> wurde über SpeI und BglII in pJKHBm6 kloniert	Diese Arbeit
pJKHBm6	<i>icfp</i> - über SacI und BamHI bzw. <i>hemD</i> _{DSM319} BamHI und SphI in p3Stop1623hp kloniert, RBS- <i>icfp-hemD</i> _{DSM319}	Keller-Hüschemenger, 2012
<i>picfphemD</i> (pJKHBm6.CF)	Shuttlevektor für die Expression von <i>icfp-hemD</i> unter Kontrolle von P _{xyIA} ^{opt.} ; <i>icfp-hemD</i> (ohne eigene RBS) über SpeI und SphI in p3Stop1623hp kloniert	Diese Arbeit
<i>piyfp-icfp</i> (pCFBm52)	Negativkontrolle: Shuttlevektor für die Coexpression von <i>iyfp</i> und <i>icfp</i> unter Kontrolle von P _{xyIA} ^{opt.} ; <i>hemD</i> _{DSM319} über BamHI und SphI aus pCFBm51 geschnitten und religiert	Diese Arbeit

3.3 Kulturmedien und Medienzusätze

3.3.1 Vollmedium für *Bacillus megaterium* und *Escherichia coli*

Für die Kultivierung der Bakterienstämme wurde in dieser Arbeit Luria Bertani (LB) Medium (Sambrook & Russel, 2001) verwendet. Für die Herstellung von Festmedien wurde 1,5 % (w/v) Agar-Agar vor dem Autoklavieren hinzugegeben.

LB Medium	Trypton	10 g/l
	Hefeextrakt	5 g/l
	NaCl	5 g/l

3.3.2 Medienzusätze

Antibiotika und andere Additive wurden in Stocklösungen angesetzt, steril filtriert und den Medien nach dem Autoklavieren bzw. zu definierten Zeitpunkten zugesetzt. Gefäße, die lichtempfindliche Substanzen wie beispielsweise Tetracyclin enthielten, wurden zum Schutz mit Alufolie umwickelt.

Tab. 6: Mediemzusätze.

Substanz	Lösemittel	Stock-Konzentration	Endkonzentration
Carbenicillin	H ₂ O _{MilliQ}	100 mg/ml	100 µg/ml
Ampicillin	H ₂ O _{MilliQ}	100 mg/ml	100 µg/ml
Tetracyclin	Ethanol 70 % (v/v)	5 mg/ml	10 µg/ml
Chloramphenicol	Ethanol 70 % (v/v)	34 mg/ml	3,4 µg/ml
IPTG	H ₂ O _{MilliQ}	1 M	400 µM
Xylose	H ₂ O _{MilliQ}	50 % (w/v)	0,5 % (w/v)
5-Aminolävulinsäure	H ₂ O _{MilliQ}	50 mg/ml	50 µg/ml

3.4 Mikrobiologische Techniken

3.4.1 Sterilisation

Wenn nicht anders angegeben, wurden Medien und Puffer bei 121°C und 1 Bar Überdruck für 20 min dampfsterilisiert. Hitzeempfindliche Substanzen oder Lösungen wurden mithilfe eines Filters (Sartorius, Göttingen, Deutschland) mit einem Porendurchmesser von 0,2 µm sterilfiltriert.

3.4.2 Bakterienkultivierung

Plattenkultivierung

Die Bakterienstämme wurden mittels einer Impföse direkt auf LB-Agarplatten, die gegebenenfalls ein entsprechendes Antibiotikum bzw. andere Additive enthielten, ausgestrichen und üN bei 30°C oder 37°C inkubiert.

Flüssigkultivierung von *Escherichia coli*

Für die Kultivierung von *E. coli* wurde zunächst eine üN Kultur (LB-Medium ggf. versetzt mit entsprechendem Antibiotikum im Reagenzglas oder Schikanekolben) mit einer Einzelkolonie von einer LB-Agarplatte angeimpft und aerob bei 37°C schüttelnd (180 rpm) inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Hauptkultur (LB-Medium ggf. versetzt mit entsprechendem Antibiotikum) 1:100 mit der üN Kultur angeimpft und schüttelnd (250 rpm) bei 37°C (wenn nicht anders angegeben) aerob bis zur gewünschten optischen Dichte inkubiert.

Flüssigkultivierung von *Bacillus megaterium*

Für die Kultivierung von *B. megaterium* wurde zunächst eine üN Kultur (50 ml LB-Medium ggf. versetzt mit entsprechendem Antibiotikum im 250 ml Schikanekolben) mit einer Einzelkolonie von einer Platte angeimpft und aerob bei 37°C schüttelnd (100 rpm) inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Hauptkultur (LB-Medium ggf. versetzt mit entsprechendem Antibiotikum im Schikanekolben) 1:50 oder 1:100 mit der üN Kultur angeimpft und schüttelnd (250 rpm) bei 37°C aerob bis zur gewünschten optischen Dichte inkubiert.

3.4.3 Bestimmung der Zelldichte

Die Bestimmung der Zelldichte einer Flüssigkultur erfolgte über die Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 578 nm (OD_{578}). Ab einer $OD_{578} > 1$ wurde die Probe für die Messung im Photometer verdünnt. Eine OD_{578} von 1 entspricht 10^7 Zellen (*B. megaterium*) bzw. 10^9 Zellen (*E. coli*) pro ml.

3.4.4 Lagerung von Bakterien

Um einen Bakterienstamm zu konservieren, wurden 650 µl einer üN Kultur mit 350 µl Glycerin (87 % (w/v)) gemischt und bei -80°C eingefroren. So können Bakterienstämme mehrere Jahre aufbewahrt werden. Bewachsene LB-Agarplatten wurden mit Parafilm luftdicht verschlossen und können so mehrere Tage (*B. megaterium*) bzw. mehrere Wochen (*E. coli*) bei 4°C gelagert werden.

3.5 Molekularbiologische Methoden

Den durchgeführten molekularbiologischen Methoden liegen die Protokollen von Sambrook & Russel zu Grunde (Sambrook & Russel, 2001). Änderungen sind im Folgenden angegeben.

3.5.1 Präparation von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*

Für die Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde zunächst der entsprechende Stamm kultiviert. Dazu wurden 5,5 ml LB Medium, welches mit entsprechendem Antibiotikum versetzt war, mit einer Einzelkolonie angeimpft und schüttelnd (180 rpm) bei 37°C üN inkubiert. Danach wurden die Zellen sedimentiert (13 000 x g, 2 min) und in 300 µl Resuspensionspuffer aufgenommen. Nach der Zugabe von 300 µl alkalischem Lysepuffer wurde die Probe vorsichtig invertiert und inkubiert, was die Dauer von 2 min nicht überschreiten sollte. Anschließend wurden 300 µl Neutralisationspuffer hinzugefügt und die Probe erneut durch Invertieren gemischt. Die ausgefällten Proteine und Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (13 000 x g, 15 min) abgetrennt und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die DNA wurde erst durch Zugabe von 600 µl Isopropanol präzipitiert und dann sedimentiert (13 000 x g, 15 min). Darauf folgte das Waschen der DNA mit 400 µl 70 % EtOH und eine Zentrifugation mit 13 000 x g über 5 min (Centrifuge, Minispin). Nachdem die DNA bei 70°C vollständig getrocknet worden war, wurde sie in 50 µl vorgewärmtem H₂O bei 37°C gelöst und anschließend bei -20°C aufbewahrt.

Wenn die Plasmid-DNA für die Sequenzierung bestimmt war bzw. *B. megaterium* mit dieser transformiert werden sollte, wurde für die Präparation mittels QIAquick Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) durchgeführt. Es wurden 2 x 5,5 ml LB-Medium versetzt mit entsprechendem Antibiotikum angeimpft und üN inkubiert (37°C, 180 rpm). Die Isolation erfolgte nach Angaben des Herstellers, wobei jeweils die DNA aus zwei Ansätzen (2 x 5,5 ml *E. coli* Kultur) über eine Säule gereinigt wurde. Nach dem Waschschrift mit PE-Puffer wurde die Säule 3 min bei 70°C getrocknet. Anschließend wurde die DNA mit 70 µl vorgewärmten H₂O eluiert.

Lösungen für die Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*:

Resuspensionspuffer	Tris-HCl pH 8	50 mM
	EDTA	10 mM
	RNase A	100 mg/l
Lysepuffer	NaOH	200 mM
	SDS	1 % (w/v)
Neutralisationspuffer	Kaliumacetat pH 5,5	3 M

3.5.2 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der Konzentration und Reinheit einer Plasmid-DNA-Lösung erfolgte mit Hilfe des Nanodrop ND 1000 Spektrometers (Peqlab Biotechnology GmbH, Erlangen, Deutschland). Dabei wurden 2 µl der DNA-haltigen Lösung auf die dafür vorgesehene Messeinheit pipettiert und die Absorption bei 280 und 260 nm gemessen. Da eine A₂₆₀ von 1 ungefähr 50 µg/ml doppelsträngiger DNA entspricht, konnte über den gemessenen Wert die Konzentration der DNA-Probe bestimmt

werden. Der Quotient aus A_{260} und A_{280} ist ein Maß für die Reinheit der DNA, wobei ein Wert zwischen 1,8 und 2 reiner DNA entspricht.

3.5.3 Agarose-Gelelektrophorese

Für eine analytische Auftrennung von DNA-Fragmenten wurde die Agarose-Gelelektrophorese herangezogen. Die DNA-Proben wurden mit 6 x Loading Dye (Fermentas, St. Leon Roth, Deutschland) versetzt, auf das Agarosegel (0,5-1,5 % (v/v) in TAE-Puffer) aufgetragen und bei 100 V elektrophoretisch nach ihrer Größe aufgetrennt. Als Größenstandard diente der GeneRuler™ DNA Ladder Mix der Firma Fermentas (St. Leon Roth, Deutschland). Nach der Elektrophorese wurde das Gel 30 min in einer Ethidiumbromidlösung gefärbt und danach kurz mit H₂O abgespült. Dann konnte es unter Anregung mit UV-Licht (λ 320 nm) photographiert (DeVision G, Decon Science Tec, Hohengandern, Deutschland) werden.

Lösungen für die Agarose-Gelelektrophorese:

TAE-Puffer	Tris-Acetat pH 8 EDTA	40 mM 1 mM
Ethidiumbromidlösung	Ethidiumbromid	0,1 % (w/v)

3.5.4 DNA-Amplifizierung mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR dient dazu, definierte DNA-Fragmente *in vitro* zu amplifizieren, wobei genomische als auch Plasmid-DNA als Template dienen kann. Im ersten Schritt wird das Template durch Hitze denaturiert (Denaturierung), so dass sich danach Primer, die komplementär zu den Enden des zu amplifizierenden Abschnitts sind, nach Abkühlen anlagern (Annealing). Diese fungieren als Startpunkt der thermostabilen Polymerase, welche dann einen neuen DNA-Strang synthetisiert (Elongation). Diese Schritte laufen in sich wiederholenden Zyklen ab, wobei die DNA Menge exponentiell steigt.

In dieser Arbeit wurden die in Tabelle 7 gezeigten PCR-Programme verwendet. Die Annealingtemperatur wurde je nach Primer variiert (50°C, 55°C, 58°C), während die Elongationszeit von der Größe des zu amplifizierenden Fragments und der Geschwindigkeit der verwendeten DNA-Polymerase abhing. In den PCR-Ansätzen (Tab. 8) kam sowohl die Phusion® High Fidelity (15-30 s/kb, New England BioLabs, Frankfurt a. M., Deutschland) als auch die BioTherm™ Taq DNA Polymerase (60 s/kb, GENE CRAFT, Köln, Deutschland) zum Einsatz. Die verwendeten Primer wurden von der Firma biomers.net (Ulm, Deutschland) bezogen und sind in Tabelle 9 dargestellt. Der Erfolg der DNA-Amplifikation wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

Tab. 7: Verwendete PCR-Programme. Der Deckel des Thermocyclers (Biometra, Göttingen, Deutschland) wurde vor Start des Programmes auf 105°C vorgeheizt. Die mit * gekennzeichneten Schritte wurden in insgesamt 30 Zyklen wiederholt.

Funktion	Phusion®		Taq-Polymerase	
	Temperatur	Dauer	Temperatur	Dauer
Initiale Denaturierung	98°C	30 s	94°C	60 s
Denaturierung*	98°C	10 s	94°C	30 s
Annealing*	50-58°C	20 s	50-58°C	60 s
Elongation*	72°C	30 s/kb	72°C	60 s/kb
Finale Elongation	72°C	10 min	72°C	10 min

Tab. 8: PCR-Pipettierschemata.

	Phusion®	Taq-Polymerase
DNA Template	10 pg Plasmid-DNA/200 ng genomische DNA	
Forward Primer	10 pmol	20 pmol
Reverse Primer	10 pmol	20 pmol
dNTPs (10 mM)	200 µM	
DNA-Polymerase	0,4 U	1 U
Reaktionspuffer (RB)	4 µl (5xRB)	2 µl (10xRB)
H ₂ O _{MilliQ}	Auf 20 µl auffüllen	

Tab. 9: Verwendete Oligonucleotide für PCR-Reaktionen. Die Sequenzen von Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen.

Primer	Primersequenz (5'-3')
tRNA Coexpression	
tAla_fw_NaeI (primCF2fw)	TGACAT <u>GCCGGC</u> CATGAGGATCAATCGTAAAAG
tAla_rv_EagI-HF (primCF3rv)	ACAT <u>CGGCCG</u> GAACCAAGCCAAATTCCAAG
tAla_fw_AflII (primRB49fw)	ACATCTTAAGCATGAGGATCAATCGTAAAAG
tAla_rv_AflII (primRB50rv)	ACATCTTAAGGAACCAAGCCAAATTCCAAG
tArg_fw_NaeI (primCF12fw)	TGACAT <u>GCCGGC</u> ATTCTCTCCGTGTTTC
tArg_rv_EagI-HF (primCF13rv)	ACAT <u>CGGCCG</u> TTCCTCCTTAACAAGAA
tArg_fw_AflII (primRB55fw)	ACATCTTAAGATTCTCTCCGTGTTTC
tArg_rv_AflII (primRB56rv)	ACATCTTAAGTTCCTCCTTAACAAGAA
tSer_fw_NaeI (primCF14fw)	TGACAT <u>GCCGGC</u> GATACTAATCGATCGAGGAC
tSer_rv_EagI-HF (primCF15rv)	ACAT <u>CGGCCG</u> GGTGTCTTAACCGCTTGACC
tLeu_fw_NaeI (primCF16fw)	TGACAT <u>GCCGGC</u> CATGTAGAAGATGCTTGACTA
tLeu_rv_NotI-HF (primCF17rv)	AC <u>GCGGCCG</u> CCCGAAGAAATGTTTGACTTGC

Primer	Primersequenz (5'-3')
tThr_fw1_AatII_NotI_BamHI (primCF37_fw1)	TGACATGACGTCGCGGCCGCACAGGATCCATTATCGTTCACCCTCCCTG
tThr_fw2_AatII (primCF41fw2)	TGACATGACGTCATTATCGTTCACCCTCCCTG
tThr_rv_AatII (primCF38rv)	TGACATGACGTCCCATACTAAGCGGGGTGC
tVal_fw_BglII (primCF39fw)	ACATAGATCTCCCGTCACGCTCCTTTATG
tVal_rv_NotI_BamHI (primCF40rv)	TGACATGCGGCCGCACAGGATCCCTTTGATTCATTTTGTAC
fdh.nativ_fw_BsrGI (primCF18fw)	GTATGTACAATGGCAAAGGTCCTGTG
fdh.nativ_rv_NotI-HF (primCF19rv)	ACATGCGGCCGCTCAGACCGCCTTCTTG
fdh.opti_fw_BsrGI (primCF20fw)	GTATGTACAATGGCTAAAGTATTATG
fdh.opti_rv_EagI-HF (primCF21rv)	ACATCGGCCGCGGAGATCTTTATACAGC
tfh.nativ/opti_fw_BsrGI (prim22_fw)	GTATGTACAATGAAAAAAGTACTTATG
tfh.opti_rv_EagI (prim23_rv)	ACATCGGCCGTTAGAATGGACAAGTTG
tfh.nativ_rv_EagI (prim24_rv)	ACATCGGCCGCTAGAACGGGCAGGTGG
Bacterial Two-Hybrid Assay	
hemD ₅₀₉ _fw_XbaI (primCF27_fw)	ACATTCTAGAGAGTCATGAGGCTCC
hemD ₅₀₉ _rv_KpnI (primCF28_rv)	ACATGGTACCCGTTCAAAACAACCTAACC
hemC ₅₀₉ _fw_XbaI (primCF29_fw)	ACATTCTAGAGCGAAAAATTATTGTCGG
hemC ₅₀₉ _rv_KpnI (primCF30_rv)	ACATGGTACCCGTTTGTCCAGCTCC
Pulldown-Assay	
hemC ₅₀₉ _fw_BamHI (primCF31_fw)	ACATGGATCCGCGAAAAATTATTGTCG
hemC ₅₀₉ _rv_NotI (primCF32_rv)	ACATGCGGCCGCTTATTTGTCCAGC
hemD ₅₀₉ _fw_BglII (primCF33_fw)	ACATAGATCTCAGTCATGAGGCTCC
hemD ₅₀₉ _rv_XhoI (primCF35_rv)	ACATCTCGAGTTATTCAAAACAACCTAACC
Förster-Resonanzenergietransfer	
icfp_fw_BglII (primCF46fw)	CATAGATCTCCTTGGATTCAATAGAAAAGGTAAGC
icfp_rv_SphI (primCF47rv)	CATGCATGCTTACTTGTACAGCTCGTCCATGC
iyfp_fw_SpeI (primRB63fw)	CATACTAGTTTGGATTCAATAGAAAAGGTAAGC

Primer	Primersequenz (5'-3')
iyfp_rv_BglII (primCF48rv)	CATAGATCTTTACTTGTACAGCTCGTCCATGC
hemD ₅₀₉ _rv_SphI (primRB70rv)	CATGCATGCTTATTCAAAACAATAACC

3.5.5 Reinigung von PCR-Amplifikaten

Die Reinigung von PCR-Amplifikaten erfolgte mittels des QIAquick PCR Purification Kits (QIAGEN, Hilden, Deutschland) nach den Angaben des Herstellers, wobei zur Elution 30 µl auf 70°C vorgewärmtes H₂O genutzt wurde.

3.5.6 Reinigung von DNA-Fragmenten mittels Gelextraktion

Falls sich in einer Probe mehr als ein DNA-Fragment befand, z.B. nach dem Restriktionsverdau eines Plasmids oder einer nicht optimal verlaufenen PCR, wurde die Probe über Agarose-Gelelektrophorese (3.5.3) aufgetrennt. Nach Färbung mit Ethidiumbromid wurde das Gel auf einen UV-Tisch (Wealtec Europe, UK) gelegt und die gewünschte Bande mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die DNA-Extraktion erfolgte mithilfe des QIAquick Gel Extraction Kits (QIAGEN, Hilden, Deutschland) gemäß der Herstellervorschrift, wobei zur Elution 70 µl auf 70°C vorgewärmtes H₂O genutzt wurde.

3.5.7 Restriktionsverdau von DNA

Für den Restriktionsverdau der DNA wurden Enzyme der Firma New England BioLabs (Frankfurt a. M., Deutschland) und Fermentas (St. Leon Roth, Deutschland) genutzt. Hierbei wurden die Angaben des Herstellers bezüglich der Komponentenkonzentrationen und Temperatur befolgt. Die Proben wurden mind. 2 h Stunden oder üN bei entsprechender Temperatur inkubiert und anschließend die DNA-Spaltung über Gelelektrophorese (3.5.3) überprüft.

3.5.8 Ligation von DNA-Fragmenten

Falls der zu ligierende Vektor *blunt*-Ends aufwies, wurden diese am 5'-Ende dephosphoryliert, um eine Religation auszuschließen. Hierfür wurde die Antarctic Phosphatase (New England BioLabs, Frankfurt a. M., Deutschland) nach Vorschrift des Herstellers verwendet und der Ansatz 2 h bei 37°C inkubiert. Um ungeschnittenen und geschnittenen Vektor zu trennen, wurde die DNA-haltige Probe mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt, die gewünschte Bande ausgeschnitten und die DNA aus dem Gel extrahiert (3.5.6). Dann konnte der Vektor für die Ligation eingesetzt werden.

Für die Ligation wurde die T4-DNA-Ligase oder das Quick Ligation Kit (beides New England BioLabs, Frankfurt a. M., Deutschland) verwendet. Die Zusammensetzung und Behandlung des Ansatzes erfolgte nach Vorschrift des Herstellers, wobei Vektor (25-100 ng) und Insert im molaren Verhältnis von 1:3 – 1:5 zum Einsatz kamen.

3.5.9 DNA-Sequenzierung

Um die Sequenzen klonierter Vektoren zu überprüfen, wurden diese von der Firma GATC (Konstanz, Deutschland) mithilfe der in Tabelle 10 angegebenen Primern sequenziert. Die erhaltenen Sequenzierdaten wurden per SeqMan Pro (DNA Star Lasergene, Madison, USA) ausgewertet.

Tab. 10: Verwendete Sequenzierprimer.

Sequenzierprimer	Primersequenz (5'-3')
seqpMM1520AflII_fw	GTGCTGTTTTATCCTTTACC
seqpMM1520AatII_fw	GAGCGGATACATATTTGAATG
seqpMM1520_fw	ATGATGAGATAAAGTTAGTTTATTGG
seqpMM1520_rv	GTTTGCGCATTACAGTTCTCC
seqP _{xy/A} _fw	AAGTTGGTGTTTTTTGAAGC
pET Upstream Primer (Novagen)	GATGCGTCCGGCGTAGAGG
DuetUP2 Primer (Novagen)	TTGTACACGGCCGCATAATC
seqhemC ₅₀₉ _fw (seqprimCF36_fw)	GTTCCCCTGTAGGACAAGG

3.5.10 Herstellung und Transformation von CaCl₂-kompetenten *Escherichia coli* Zellen

Herstellung von CaCl₂-kompetenten *E. coli* Zellen

Für die Herstellung CaCl₂-kompetenter *E. coli* Zellen wurde der entsprechende *E. coli* Stamm zunächst auf eine LB-Agarplatte ausgestrichen. Von dieser wurde eine üN Kultur (5 ml LB Medium) angeimpft und bei 37°C schüttelnd (180 rpm) inkubiert. Am nächsten Morgen wurde 100 ml LB-Medium in einem 500 ml Schikanekolben mit der üN-Kultur 1:100 angeimpft und bei 37°C unter kräftigem Schütteln (250 rpm) bis zu einer OD₅₇₈ von 0,6-0,8 kultiviert. Darauf wurde die Kultur in zwei 50 ml Falkons überführt und 10 min auf Eis inkubiert. Nachdem die Zellen sedimentiert (10 min, 2 500 x g, 4°C) worden waren, wurde der Überstand vollständig abgenommen und die sedimentierten Zellen vorsichtig in einer eiskalten CaCl₂-Lösung resuspendiert. Die Ansätze wurden dann 15 min auf Eis gelagert und anschließend zentrifugiert (10 min, 2 500 x g, 4°C). Erneut wurde der Überstand abgenommen, die sedimentierten Zellen vorsichtig in 1 ml CaCl₂-Lösung resuspendiert und in vorgekühlte Reaktionsgefäße zu 52 µl aliquotiert. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

Lösung für die Herstellung von CaCl₂-kompetenter *E. coli* Zellen:

CaCl ₂ -Lösung	CaCl ₂	100 mM
	Glycerin	10 % (w/v)

Transformation von CaCl₂-kompetenten *E. coli* Zellen

Für die Transformation wurde vorsichtig 1 µl Plasmid-DNA bzw. 5 µl Ligationsansatz mit 25 µl bzw. 50 µl der kompetenten *E. coli* Zellen gemischt und anschließend 20 min auf Eis inkubiert. Dann folgte der Hitzeschock bei 42°C für 45 s und eine Abkühlung (2 min) der Zellen auf Eis. Anschließend wurden

der Ansatz bei 37°C unter Schütteln (750 rpm) im Thermomixer (Eppendorf, Deutschland) inkubiert. Nach 0,5 - 1 h wurden die Zellen auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotika-Zusatz ausplattiert und üN bei 37°C inkubiert.

3.5.11 Herstellung und Transformation von *Bacillus megaterium* Protoplasten

Herstellung von *B. megaterium* Protoplasten

Für die Herstellung von *B. megaterium* Protoplasten wurde zunächst 50 ml LB-Medium in einem 250 ml Schikanekolben mit entsprechendem *B. megaterium* Stamm, der zuvor auf einer LB-Agarplatte ausgestrichen worden war, inokuliert und schüttelnd inkubiert (16 h, 100 rpm, 37°C). Am nächsten Morgen wurde die Hauptkultur (50 ml LB-Medium in einem 300 ml Schikanekolben) 1:50 mit der üN Kultur angeimpft und bis zu einer OD₅₇₈ von 1 schüttelnd (250 rpm) kultiviert. Danach wurden die Zellen sedimentiert (20 min, 4000 x g, 4°C) und anschließend in 5 ml frisch hergestellter SMMP-Lösung resuspendiert. Für die Protoplastierung der Zellen wurde 100 µl Lysozymlösung (1 mg/ml in SMMP) zugegeben und der Ansatz schwenkend bei 37°C inkubiert bis ca. 80 % der Zellen bei Betrachtung unter dem Mikroskop eine kugelige Form zeigten und somit protoplastiert waren. Dann wurde der Ansatz vorsichtig abzentrifugiert (10 min, 1 300 x g, RT) und die sedimentierten Protoplasten vorsichtig in 5 ml SMMP gewaschen. Anschließend wurde die Protoplasten erneut in 5 ml SMMP aufgenommen, mit 750 µl Glycerin (87 % (w/v)) versetzt und in 500 µl Aliquots bei -80°C eingefroren.

Transformation von *B. megaterium* Protoplasten

Für die Transformation wurde zunächst 500 µl Protoplastensuspension zu 1-5 µg der zu transformierenden Plasmid-DNA gegeben und dieses Gemisch in ein 15 ml Falcon überführt, in welches bereits 1,5 ml PEG-P vorgelegt worden war. Um eine gleichmäßige Verteilung der Probe im PEG-P herbeizuführen, wurden der Ansatz auf dem Tisch gerollt und 2 min bei RT inkubiert. Nach der vorsichtigen Zugabe von 5 ml SMMP wurden die Zellen sedimentiert (10 min, 1 300 x g, RT), der Überstand verworfen und das Sediment in 500 µl SMMP resuspendiert. Dieser Ansatz wurde in ein Eppendorfgefäß überführt und nach einer Inkubation von 45 min bei 30°C ohne Schütteln weitere 45 min bei 30°C bei 300 rpm inkubiert. Anschließend wurde dieser Ansatz in 2,5 ml CR5-Topagar, welcher in einem 15 ml Falcon vorgelegt worden war, gleichmäßig verteilt und auf eine vorgewärmte LB-Agarplatte mit entsprechendem Antibiotikum gegeben. Diese wurde üN bzw. bis zu 24 h bei 30°C inkubiert. Gewachsene Klone wurden auf neuen mit entsprechendem Antibiotikum versetzten LB-Agarplatten ausgestrichen und üN bei 37°C inkubiert.

Lösungen für die Herstellung und Transformation von *B. megaterium* Protoplasten:

SMMP	2 x AB3 und 2 x SMM im Verhältnis 1:1	
2 x AB3	Antibiotic Medium Nr. 3 (Difco)	35 g/l
2 x SMM pH 6,5	Maleinsäure	40 mM
	NaOH	80 mM
	MgCl ₂	40 mM
	Saccharose	1 M
PEG-P	PEG-6000	40 % (w/v)
	gelöst in 1 x SMM	500 mM
Lösung A pH 7,3	Saccharose	602 mM
	MOPS	58 mM
	NaOH	30 mM
Lösung B	Agar	4 % (w/v)
	Casaminosäuren	0,2 % (v/w)
	Hefeextrakt	10 % (v/w)
8 x CR5-Salze	K ₂ SO ₂	11 mM
	MgCl ₂	394 mM
	KH ₂ PO ₄	3 mM
	CaCl ₂	159 mM
CR5-Topagar (2,5 ml)	Lösung A	1, 25 ml
	Lösung B	713 µl
	8 x CR5-Salze	288 µl
	L-Prolin (12 % (w/v))	125 µl
	D-Glucose (20 % (w/v))	125 µl

3.6 Rekombinante Proteinproduktion und Proteinanalyse

3.6.1 Rekombinante Proteinproduktion in *Bacillus megaterium*

Für die rekombinante Proteinproduktion wurden die jeweiligen *B. megaterium* Plasmid-Stämme auf LB-Tet (10 µg/ml)-Agarplatten ausgestrichen und üN bei 37°C inkubiert. Davon wurde am nächsten Tag die Vorkultur mit 50 ml LB Medium, welches mit Tetracyclin (10 µg/l) versetzt worden war, in einem 250 ml oder 300 ml Schikanekolben angeimpft und schüttelnd üN bei 37°C und 100 rpm inkubiert. Die Hauptkultur (50 ml, 100 ml oder 250 ml) mit Tetracyclin versetztem LB Medium in einem (300 ml, 500 ml oder 1 l) Schikanekolben wurde 1: 100 mit der üN Kultur angeimpft und schüttelnd (250 rpm) bei 37°C inkubiert. Die heterologe Genexpression wurde bei einer OD₅₇₈ von 0,3-0,4 mit 0,5 % (w/v) Xylose induziert.

3.6.2 Präparation der löslichen, intrazellulären Proteinfraction von *Bacillus megaterium*

Diese Methode wurde wie in Malten *et al.*, (2005) beschrieben durchgeführt. Sechs Stunden nach Induktion der rekombinanten Genexpression wurden Proben aus den entsprechenden *B.*

megaterium Kulturen entnommen und mit Natriumphosphatpuffer (100 mM, pH 7) auf 3×10^7 (\cong OD₅₇₈ = 3) Zellen eingestellt. Die Zellen wurden sedimentiert (13 000 x g, 10 min, 4°C) und in 30 µl Lysepuffer, welcher kurz vor Gebrauch mit 2 µl/ml Benzonase (25 U/µl, Merck Millipore, Dortmund, Deutschland)) versetzt worden war, resuspendiert. Dann wurden die Proben 30 min im Thermomixer (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) bei 37°C schüttelnd (1 000 rpm) inkubiert und anschließend zentrifugiert (13 000 x g, 15 min, 4°C). 26 µl des Überstands, welcher die löslichen Proteine enthielt, wurden abgenommen und mit 13 µl SDS-Ladepuffer versetzt. Nach 5-minütigem Erhitzen der Probe auf 95°C wurden 7 µl bzw. 18 µl auf ein SDS-Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt.

Lösung für die Präparation der löslichen, intrazellulären Proteinfraktion von *B. megaterium*:

Lysepuffer pH 6,5	Na ₃ PO ₄	100 mM
	MgSO ₄	2 mM
	Lysozym	5 mg/ml
	Benzonase (25 U/µl)	2 µl/ml

3.6.3 Rekombinante Proteinproduktion von *His-HemC* und *His-HemD* in *Escherichia coli*

Die rekombinante Proteinproduktion von HemC bzw. HemD aus *B. megaterium* DSM509, die beide mit einem His-Tag fusioniert waren, wurde nach Keller-Hüschemenger (2012) durchgeführt. *E. coli* BL21 (DE3) StarTM pLysS wurden mit entsprechendem Plasmid (pSD1 bzw. pSD2) transformiert, auf einer LB-Agarplatten, die mit Chloramphenicol (34 µg/ml) und Ampicillin (100 µg/ml) versetzt war, ausgestrichen und üN bei 37°C inkubiert. Von diesen Platten wurden 4 x 5,5 ml LB Medium supplementiert mit entsprechenden Antibiotika im Reagenzglas angeimpft und üN bei 37°C schüttelnd (180 rpm) inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Hauptkulturen (4 x 1 l Schikanekolben gefüllt mit je 500 ml antibiotikaversetztem LB Medium) 1:100 mit der üN Kultur angeimpft und schüttelnd (200 rpm) bei 37°C inkubiert. Bei einer OD₅₇₈ von 1 wurde die Genexpression mit 400 µM IPTG induziert und die Kulturen weiter üN bei 17°C schüttelnd (200 rpm) inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen geerntet (3000 x g, 20 min, 4°C).

3.6.4 Zellaufschluss mittels Ultraschall

Die Zellen aus 2 l *E. coli* Kultur wurde geerntet (3 000 x g, 20 min, 4°C), in 8 ml Bindepuffer versetzt mit 0,5 µl Benzonase (Merck Millipore, 250 U/µl) resuspendiert und in Falkons überführt. Danach erfolgte der Zellaufschluss auf Eis mittels Ultraschallhomogenisator (Sonoplus, Bendelin, Berlin, Deutschland). Dabei wurde die Sonotrode MS72 verwendet. Der Aufschluss erfolgte über 5 min mit einem Cycle von 60 % und einer maximalen Power von 70 %. Diese Behandlung wurde 3 x mit 5-minütigen Pausen wiederholt. Anschließend wurde das Zelllysate in 2 ml Eppendorfgefäße überführt und zentrifugiert (13 000 x g, 30 min, 4°C), um die Zelltrümmer abzutrennen. Der zellfreie Extrakt konnte dann für weitere Experimente eingesetzt werden.

Lösung für den Zellaufschluss mittels Ultraschall:

Bindepuffer	Tris-HCl pH 8,4	50 mM
	NaCl	500 mM
	MgCl ₂	2 mM
	Glycerin	20 %
	Imidazol	10 mM
	Benzonase	15,6 U/ml

3.6.5 Zellaufschluss mittels Kugelmöhlenverfahren

Die Zellen von FDH produzierenden *B. megaterium* Stämmen wurde sedimentiert (3000 x g, 20 min, 4°C), in Natriumacetatpuffer (50 mM, pH 5.5) resuspendiert und auf eine OD₅₇₈ von 9 eingestellt. 1 ml dieser Zellsuspension wurde in ein 2 ml Eppendorfgefäß gegeben, in das bereits 600 mg Glaskugeln (Durchmesser: 38-45 µm, Worf GmbH, Mainz, Deutschland) vorgelegt worden waren. Die Ansätze wurden bei 4°C 2 x 45 s mit einer Geschwindigkeit von 6,5 m/s im FastPrep®-24 Homogenisator (MP Biomedical, USA) mechanisch behandelt. Zwischen den Zyklen wurde 2 Minuten pausiert. Danach wurden die Proben zentrifugiert (13 000 x g, 30 min, 4°C), um die Glaskugeln und Zelltrümmer abzutrennen. Der proteinhaltige Überstand konnte dann im Formiat-Assay eingesetzt werden (3.6.14).

3.6.6 Proteinreinigung von His-HemC und His-HemD mittels Affinitätschromatographie

Für die affinitätschromatographische Reinigung von His-HemC bzw. His-HemD wurde zunächst eine 15 ml-Tropfsäule mit 7 ml Chelating Sepharose Fast Flow (GE Healthcare, GB) bestückt. Diese Matrix wurde mit 10 SV H₂O_{deion} gewaschen. Anschließend wurde die Säule verschlossen, 2 SV Nickelsulfatlösung (100 mM) zugegeben und so 10 min inkubiert. Danach wurde die nun mit Ni²⁺-Ionen beladenen Matrix mit 5 SV H₂O_{deion} gewaschen und mit 5 SV Waschpuffer äquilibriert. Dann wurde der Zielprotein-enthaltende Zelleextrakt (3.6.4) auf die Säule gegeben, welche im Anschluss mit 5 SV Bindpuffer und 4 SV Waschpuffer gewaschen wurde. Die Elution der an der Säule gebundenen Proteine erfolgte mit 2 SV Elutionspuffer, wobei die Fraktionen zu je 1 ml aufgefangen wurden. 5 µl jeder Elutionsfraktion wurden mit 5 µl SDS-Ladepuffer versetzt und kurz aufgekocht. 2 µl wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und analysiert.

Die Säulenmatrix wurde mit 10 SV H₂O_{deion} gewaschen und anschließend bis zur nächsten Verwendung in 20 % EtOH bei 4°C gelagert.

Wenn das Säulenmaterial über einen längeren Zeitraum nicht mehr verwendet wurde, wurde sie erst mit 2 SV Regenerationspuffer, um die Nickelionen zu entfernen, und anschließend mit 2 SV 6 M Guanidiniumhypochloridlösung behandelt, um noch verbliebende Proteine zu denaturieren und auszuspülen. Nach dem Waschen mit 10 SV H₂O_{deion} konnte es in 20 % EtOH bei 4°C gelagert und bei Bedarf erneut mit Nickelionen beladen werden.

Lösungen für die Affinitätschromatographie:

Bindepuffer	Tris-HCl pH 8,4	50 mM
	NaCl	500 mM
	MgCl ₂	2 mM
	Glycerin	20 %
	Imidazol	10 mM
Waschpuffer	Tris-HCl pH 8,4	50 mM
	NaCl	500 mM
	MgCl ₂	500 µM
	Glycerin	20 %
	Imidazol	50 mM
Elutionspuffer	Tris-HCl pH 8,4	50 mM
	NaCl	500 mM
	Glycerin	10-20 %
	Imidazol	400 mM
Regenerationspuffer	Tris-HCl pH 8	20 mM
	EDTA	50 mM
	NaCl	500 mM

*3.6.7 Proteinreinigung von His-HemC und His-HemD mittels**Gelpermeationschromatographie (GPC)*

Proteine müssen eine hohe Reinheit aufweisen und von hochmolekularen Aggregaten befreit sein, um sie für die Antikörperproduktion oder Kristallisation einzusetzen. Daher wurde der affinitätschromatographischen Reinigung von His-HemC bzw. His-HemD eine Reinigung mittels Gelpermeationschromatographie (GPC) nachgeschaltet, die gleichzeitig auch der Entfernung des Imidazols aus den Proteinproben diene. Die präperative GPC erfolgte mittels Äkta Purifier System (GE Healthcare, München, Deutschland) bei 17°C, wobei die Säule HiLoad 16/60 Superdex 75 (GE Healthcare, München, Deutschland) zum Einsatz kam. Alle verwendeten Puffer und Lösungen, die bei der GPC verwendet wurden, wurden zuvor entgast und filtriert (Porendurchmesser 0,4 µm). Die Säule wurde zunächst mit 3 SV H₂O_{deion} gewaschen und anschließend mit Dialysepuffer so lange äquilibriert bis der Druck konstant war. Die fünf Elutionsfraktionen der Affinitätschromatographie (3.6.6) mit der höchsten Proteinkonzentration (3.6.9) wurden zentrifugiert (13 000 x g, 30 min, 4°C), um ausgefallene Proteine abzutrennen. Die Überstände wurden dann vereinigt und über einen 5 ml Loop auf die Säule gepumpt. Bei der Wahl der Flussgeschwindigkeit wurde darauf geachtet, dass der vom Hersteller angegebene Druck von 0,5 bar nicht überschritten wurde. Nach Passage durch die Säule wurden die Proteine über den UV-Detektor bei 280 nm detektiert und über einen Fraktionierer gesammelt. Fraktionen, die Protein enthielten, wurden zur Stabilisierung mit 5 mM DTT und 20 %

Glycerin versetzt, außer wenn sie zur Antikörpergenerierung eingesetzt werden sollten. Anschließend wurde die Säule mit 1 SV Dialysepuffer, 2 SV H₂O_{deion} und 3 SV 20 % EtOH gespült und in 20 % EtOH bei 4°C gelagert.

Lösung für die GPC:

Dialysepuffer	Tris-HCl pH 8,4	20 mM
	NaCl	500 mM

3.6.8 *Thermofluor Assay*

Diese Methode wird dazu verwendet, Pufferbedingungen zu finden, um das gewünschte Protein optimal zu stabilisieren. Diese werden über die Denaturierungstemperatur des Proteins bestimmt. Bei steigender Temperatur denaturiert das Protein nach und nach, wobei hydrophobe Reste exponiert werden. Daran lagert sich SYPROTM Orange an und fluoresziert. Über die steigende Fluoreszenz bei steigender Temperatur wird die sogenannte „Schmelztemperatur“ in der jeweiligen Pufferzusammensetzung bestimmt. Der Thermofluor Assay wird in einer qRT-PCR Maschine (Thermocycler CFX96, Bio-Rad, USA) durchgeführt. Das Pipettieren der Proben erfolgt ausnahmslos auf Eis.

Um die optimale His-HemD- und SYPROTM Orange-Konzentration zu bestimmen, wurden verschiedene Ansätze mit variierenden Konzentrationen in eine transparente 96-Wellplatte (Microseal®, Bio-Rad, USA) pipettiert. Dabei wurde 40 µl des Puffers, in dem sich das gereinigte His-HemD befand, mit 5 µl His-HemD (0,5 mg/ml, 1 mg/ml, 2 mg/ml) und je 5 µl 5000 x, 100 x, 50 x oder 10 x SYPROTM Orange gemischt. Die 96-Wellplatte wurde mit einer transparente Schutzfolie verschlossen und in den Thermocycler gestellt. Hier wurden die Proben von 10°C auf 90°C in 0,5°C Schritten erhitzt. Jede Temperatur wurde für 15 s gehalten und währenddessen die Fluoreszenz gescannt. Über die Software CFX Manager (Bio-Rad, USA) konnten die Daten ausgewertet werden, wobei geprüft wurde, bei welcher Kombination aus Protein- und Fluoreszenzfarbstoffkonzentration die Signale gut zu detektiert waren. Im nächsten Schritt wurden andere Puffer getestet. Hierfür wurde 5 µl His-HemD in vorher ermittelter Konzentration (1 mg/ml) und 5 µl SYPROTM Orange in vorher ermittelter Konzentration (50 x) in 96-Wellplatten pipettiert und 40 µl der in Tabelle 11, Reihe 1-4 aufgeführten Puffer zugegeben. Die Behandlung und Auswertung erfolgte wie oben beschrieben. Um schließlich noch unterschiedliche Additive zu testen, wurden erneut 5 µl His-HemD (1 mg/ml) und 5 µl 50 x SYPROTM Orange in 96-Wellplatten pipettiert und mit 5 µl des vorher ermittelten Puffers (50 mM Tris pH 8.4, 400 mM NaCl) in 8 x Konzentration und 35 µl des jeweiligen Additivs (Tab. 11, Reihe 5 und 6) versetzt. Das weitere Vorgehen erfolgte wie oben beschrieben.

Tab. 11: Verschiedene Pufferbedingungen und Additive, die im Thermofluor Assay überprüft wurden.

1	40mM Acetat pH 4,0	40mM Acetat pH 4,4	40mM Citrat pH 5,0	40mM Citrat pH 5,4	40mM MES pH 6,0	40mM MES pH 6,4	40mM HEPES pH 7,0	40mM HEPES pH 7,4	40mM Tris-HCl pH 8,0	40mM Tris-HCl pH 8,4	40mM CHES pH 9,0	40mM CHES pH 9,4
2	40mM Acetat pH 4,0 80mM NaCl	40mM Acetat pH 4,4 80mM NaCl	40mM Citrat pH 5,0 80mM NaCl	40mM Citrat pH 5,4 80mM NaCl	40mM MES pH 6,0 80mM NaCl	40mM MES pH 6,4 80mM NaCl	40mM HEPES pH 7,0 80mM NaCl	40mM HEPES pH 7,4 80mM NaCl	40mM Tris-HCl pH 8,0 80mM NaCl	40mM Tris-HCl pH 8,4 80mM NaCl	40mM CHES pH 9,0 80mM NaCl	40mM CHES pH 9,4 80mM NaCl
3	40mM Acetat pH 4,0 160mM NaCl	40mM Acetat pH 4,4 160mM NaCl	40mM Citrat pH 5,0 160mM NaCl	40mM Citrat pH 5,4 160mM NaCl	40mM MES pH 6,0 160mM NaCl	40mM MES pH 6,4 160mM NaCl	40mM HEPES pH 7,0 160mM NaCl	40mM HEPES pH 7,4 160mM NaCl	40mM Tris-HCl pH 8,0 160mM NaCl	40mM Tris-HCl pH 8,4 160mM NaCl	40mM CHES pH 9,0 160mM NaCl	40mM CHES pH 9,4 160mM NaCl
4	40mM Acetat pH 4,0 400mM NaCl	40mM Acetat pH 4,4 400mM NaCl	40mM Citrat pH 5,0 400mM NaCl	40mM Citrat pH 5,4 400mM NaCl	40mM MES pH 6,0 400mM NaCl	40mM MES pH 6,4 400mM NaCl	40mM HEPES pH 7,0 400mM NaCl	40mM HEPES pH 7,4 400mM NaCl	40mM Tris-HCl pH 8,0 400mM NaCl	40mM Tris-HCl pH 8,4 400mM NaCl	40mM CHES pH 9,0 400mM NaCl	40mM CHES pH 9,4 400mM NaCl
5	1% (w/v) Glycerin	5% (w/v) Glycerin	10% (w/v) Glycerin	20% (w/v) Glycerin	3% (w/v) DMSO	1mM DTT	5mM DTT	10mM CaCl ₂	10mM MgCl ₂	10mM ZnCl ₂	10mM NiCl ₂	10mM FeCl ₃
6	100mM KCl	10mM ArgininHCl	10mM Alanin	10mM Methionin	100mM Glycin	3% (w/v) Saccharose	3% (w/v) Glucose	10mM Hamstoff	0,01% (w/v) TritonX-100	Milli Q		

3.6.9 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford-Assay

Die Konzentrationsbestimmung gereinigter Proteine erfolgte über den Bradford-Assay (Bradford, 1976). Dieser ist eine photometrische Methode, bei der Coomassie-Brilliant-Blue G250 mit Proteinen einen unlöslichen Komplex bildet, dessen Absorptionsmaximum bei 595 nm liegt. Über einen Standard, für dessen Erstellung Rinderserumalbumin (BSA, Roth, Karlsruhe, Deutschland) gelöst im verwendeten Puffer verwendet wird, kann dann die Proteinkonzentration in der Probe bestimmt werden. Zur Durchführung des Tests wurde das Bradford Reagenz der Firma Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) verwendet und die Hinweise des Herstellers befolgt.

3.6.10 Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Über Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) können Proteinen nach ihrer relativen Molekülmasse gelelektrophoretisch aufgetrennt werden. Hierfür werden die Proteine zunächst denaturiert, auf ein SDS-Gel aufgetragen, in einer Gelelektrophoresekammer (Mini Protean III System, Bio-RAD, München, Deutschland) elektrophoretisch getrennt und anschließend durch das Färben mit Coomassie Brilliant Blue sichtbar gemacht.

Die SDS-PAGE wurde nach Laemmli mit Modifikationen von Righetti durchgeführt (Laemmli, 1970). Die Proteinprobe wurde 4:1 mit SDS-Ladepuffer versetzt und bei 95°C für 5 min erhitzt. Anschließend wurden 2-17 µl der Proben auf das SDS-Gel geladen und bei 45 mA für 30-45 min aufgetrennt, wobei sich nach dem Prinzip der diskontinuierlichen SDS-PAGE zunächst alle Proteine im Sammelgel sammeln und erst im Trenngel nach ihrer molekularen Masse aufgetrennt werden. Als Größenstandard diente der Unstained Protein Molecular Weight Marker oder die PageRuler™ Prestained Protein Ladder (beide MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland). Nach der

Elektrophorese wurden die Gele entweder direkt für die Western Blot Analyse eingesetzt oder schüttelnd in Färbelösung inkubiert. Darauf folgte die Inkubation in Entfärbelösung bis die gefärbten Proteinbanden vor dem entfärbten Hintergrund sichtbar waren. Zur Dokumentation wurden die Gele eingescannt und anschließend getrocknet.

Lösungen für die SDS-PAGE:

4 x SDS-Probenpuffer	Tris-HCl pH 6,8	250 mM
	Glycerin	25 % (w/v)
	SDS	8 % (w/v)
	β-Mercaptoethanol	8 % (v/v)
	Bromphenolblau	350 µM
Sammelgelpuffer	Tris-HCl pH 6,8	500 mM
	SDS	0,4 % (w/v)
Trenngelpuffer	Tris-HCl pH 8,8	1,5 M
	SDS	0,4 % (w/v)
APS-Lösung	Ammoniumperoxodisulfat gelöst in H ₂ O _{deion}	10 % (w/v)
Trenngel (12 % (w/v) für 4 Gele	Acrylamidstocklösung Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1) (Roth)	8 ml
	Trenngelpuffer	5 ml
	H ₂ O _{deion}	7 ml
	APS-Lösung	200 µl
	TEMED	
	(N,N,N',N'-Tetra- Methylethylendiamin)	20 µl
Sammelgel (6 % (w/v) für 4 Gele	Acrylamidstocklösung Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1) (Roth)	2 ml
	Sammelgelpuffer	2,5 ml
	H ₂ O _{deion}	5,5 ml
	APS-Lösung	100 µl
	TEMED	
	(N,N,N',N'-Tetra- Methylethylendiamin)	10 µl
Elektrophoresepuffer	Tris-HCl pH 8,8	50 mM
	Glycin	385 mM
	SDS	0,1 % (w/v)
Färbelösung	Essigsäure	10 % (v/v)
	Ethanol	30 % (v/v)
	Coomassie Brilliant Blue-250	0,25 % (w/v)

Entfärbelösung	Essigsäure	30 % (v/v)
	Ethanol	10 % (v/v)

3.6.11 Western Blot

Der Western Blot ist ein sensitives Verfahren, um Proteine spezifisch nachzuweisen. Zunächst werden die Proteine gelelektrophoretisch aufgetrennt, dann über ein *semidry-blot*-Verfahren auf eine Polyvinylidenfluoridmembran (PVDF, Merck Millipore, Billerica, USA) bzw. Nitrocellulosemembran (GE Healthcare, München, Deutschland) übertragen und anschließend mittels enzymgekoppelter Antikörper nachgewiesen.

Dafür wurde das Gel nach der SDS-PAGE 15 min in Towbin-Puffer_{PVDF} bzw. Transferpuffer_{NC} geschwenkt. Für den Blot-Vorgang wurden zwei Whatman-Paper und eine Membran in der Größe des SDS-Gels zugeschnitten. Während die Whatman-Paper sofort in entsprechendem Puffer getränkt wurden, musste die jeweilige Membran zunächst mit 100 % Methanol (PVDF-Membran) bzw. mit MilliQ (Nitrocellulosemembran) aktiviert werden. Danach wurden auch sie im entsprechenden Puffer äquilibriert. Die Übertragung der Proteine vom SDS-Gel auf die jeweilige Membran erfolgte mittels eines Turbo Blotters (Bio-Rad, München, Deutschland). Dafür wurde zunächst ein Whatman-Paper auf den Plus-Pol der Blottingapparatur gelegt, darauf folgte die Membran, das SDS-Gel und abschließend das zweite Whatman-Paper. Der Transfer erfolgte bei 25 V für 13 min. Wenn der Blot zur Analyse der monoklonalen Antikörper bestimmt war, wurde die Nitrocellulosemembran in TBS Puffer geschwenkt und getrocknet. Für die Detektion von Proteinen wurde die Membran in 4°C mit Blockinglösung unter leichtem Schütteln inkubiert, um freie Bindestellen abzusättigen. Am nächsten Morgen wurde der Blot weitere 30 min bei RT geschwenkt und anschließend mit dem Primärantikörper (Tab. 12) in Blockinglösung für 1 h inkubiert. Danach wurde der Blot 3 x 10 min mit Washlösung gewaschen, bevor die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (Tab. 12) in Washlösung für 45 min erfolgte. Anschließend wurde der Blot 4 x 10 min mit PBS-Tween gewaschen.

Detektion über Farbreaktion

War der Sekundärantikörper mit der alkalischen Phosphatase (AP) gekoppelt, wurde der Blot 10 min im alkalischen Phosphatasepuffer (APB) geschwenkt. Danach wurde das Färbereagens zugegeben, dessen Inhaltsstoffe 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (BCIP) und Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT) katalysiert durch die AP ein violette Produkt bilden. Die Reaktion wurde durch Waschen mit H₂O abgestoppt. Zur Dokumentation wurde die Membran eingescannt, getrocknet und lichtgeschützt gelagert.

Detektion über Chemilumineszenz

War der Sekundärantikörper mit HRP (Meerrettich-Peroxidase) gekoppelt, wurde auf die Membran die Lösungen A und B, die zuvor im Verhältnis 1:1 gemischt worden waren, des Amersham ECLTM

Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare, USA) aufgetropft. Bei der Umsetzung des Substrats Luminol in den ECL-Reagenzien durch die Meerrettich-Peroxidase wird Licht emittiert. Die Detektion bzw. Dokumentation der Chemilumineszenz erfolgte mittels der Chemilumineszenz-Dokumentationsanlage (CoolSNAP HQ², Photometrix, Australien).

Lösungen für den Western Blot:

Transferpuffer (für Nitrocellulosemembran)	Tris-HCl pH 8,8	21,3 mM
	Glycin	192 mM
	Methanol	10 % (v/v)
TBS (für Nitrocellulosemembran)	Tris-HCl pH 7,5	50 mM
	NaCl	150 mM
Towbinpuffer (für PVDF-Membran)	Tris-HCl pH 9,5	25 mM
	Glycin	192 mM
	Methanol	20 % (v/v)
10 x PBS	NaCl	137 mM
	KCl	27 mM
	Na ₂ HPO ₄	100 mM
	KH ₂ PO ₄	20 mM
Blockinglösung	Magermilchpulver	5 % (w/v)
	Tween20	0,1 % (v/v)
	10 x PBS	10 % (v/v)
Waschlösung	Magermilchpulver	0,5 % (w/v)
	Tween20	0,1 % (v/v)
	10 x PBS	10 % (v/v)
1 x PBS Tween	10 x PBS	10 % (w/v)
	Tween20	0,1 % (v/v)
Alkalischer Phosphatasepuffer (APB)	Tris-HCl pH 9,5	100 mM
	NaCl	100 mM
	MgCl ₂	5 mM
Färbereagenz	APB	10 ml
	NBT-Lösung (100 mg/ml in 70 % Dimethylformamid)	33 µl
	BCIP-Lösung (50 mg/ in Dimethylformamid)	33 µl
Blotting Detection Reagent (GE Healthcare, USA)	Solution A	50 %
	Solution B	50 %

Tab. 12: Antikörper und Antikörperkonjugat für die Immunodetektion.

Antikörper	Hersteller	Verdünnung
primär		
Anti-GFP-Antikörper (aus Kaninchen)	Gabe von Dr. A. Nuss (HZI, Braunschweig)	1 : 10 000
Anti-HemC-Antikörper (aus Maus) 3A9 6C1 7D8 7G6	Sabine Buchmeier (Antibody Facility, TU Braunschweig)	unverdünnt
Anti-HemC-Antikörper (aus Kaninchen) UDA/13 3,43 mg/ml, α C1 UDA/13 2,71 mg/ml, α C2	Metabion	1 : 10 000
Anti-HemD-Antikörper (aus Maus) 3C2 3D1 5H11 6A1 6E10	Sabine Buchmeier (Antibody Facility, TU Braunschweig)	unverdünnt
Anti-HemD-Antikörper (aus Kaninchen) CEA/13, 1,82 mg/ml, α D1 CEA/13 1,78 mg/ml, α D2	Metabion	1 : 1 750
sekundär		
Anti-Kaninchen IgG (H+L)-AP (aus Ziege)	Sigma-Aldrich	1 : 10 000
Anti-Kaninchen IgG (H+L)-HRP (aus Ziege)	Dianova	1 : 10 000
Anti-Maus IgG (H+L)-AP (aus Kaninchen)	Sigma-Aldrich	1 : 16 000
Anti-Maus IgG (H+L)-HRP (aus Ziege)	Dianova	1 : 10 000
Clean-Blot™ IP Detection Reagent (HRP)	Thermo Scientific	1 : 2 000

3.6.12 Generierung von Antikörpern

Um Antikörper gegen His-HemC bzw. His-HemD aus *B. megaterium* DSM509 zu generieren, wurden diese Proteine zunächst in *E. coli* rekombinant produziert (3.6.3) und anschließend über Affinitäts- und Gelpermeationschromatographie (3.6.6, 3.6.7) gereinigt.

Monoklonale Antikörper

Für die Generierung von monoklonalen Antikörper wurden diese hochreinen Proteine an Sabine Buchmeier (Antibody Facility, TU Braunschweig) weitergegeben, die die Immunisierung der Mäuse, Erzeugung der Hybridomazellen und anschließende Überprüfung der produzierten Antikörper mittels ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) und Western Blot Analyse vornahm. Die erhaltenen Antikörper befanden sich in Kulturmedium (DMEM, Merck Millipore, USA) und wurden so zur weiteren Überprüfung bzw. für weitere Anwendungen eingesetzt. Ein Teil der anti-HemD 6A1 Antikörper wurde von Dr. André Frenzel über eine Protein A-Sepharosesäule gereinigt und lagen dann in PBS Puffer vor. Diese gereinigten Antikörper wurden bei der Co-Immunopräzipitation (3.6.20) eingesetzt.

Polyklonale Antikörper

Für die Generierung polyklonaler Antikörper wurden die hochreinen Proteine (ca. 30 mg His-HemC und 20 mg His-HemD) an die Firma Metabion (München, Deutschland) geschickt, wo diese dann zur Immunisierung von Kaninchen eingesetzt wurden. Aus dem Kaninchenserum wurden dann die polyklonalen Antikörper über antigenbeschichtete Chromatographiesäulen gereinigt und anschließend mittels ELISA getestet. Die erhaltenen Antikörper lagen in Trispuffer (100 mM, pH 7) mit 500 mM NaCl und 10 mM Glycin vor und wurden so für weitere Überprüfung und Anwendungen eingesetzt.

3.6.13 Visualisierung und Quantifizierung der GFP-Fluoreszenz

Um die GFP Produktion verschiedener *B. megaterium* Plasmid-Stämme visuell zu zeigen, wurden diese auf LB-Agarplatten, die mit 10 µg/ml Tetracyclin und 0,5 % (w/v) Xylose versetzt waren, ausgestrichen. Diese wurden üN bei 37°C inkubiert, dann auf einen Blauschirm gelegt und durch einen Gelbfilter fotografiert (CanonEOS 450D, Tokio, Japan).

Die Menge an produziertem GFP in den Plasmid-Stämmen wurde über Fluoreszenzspektroskopie (Luminescence Spectrometer LS50B, PerkinElmer, Boston, USA) quantitativ bestimmt (nach Biedendieck *et al.*, (2007)). Dazu wurden entsprechende Plasmid-Stämme kultiviert und die *gfp* Expression bei einer OD₅₇₈ zwischen 0,3 und 0,4 mit 0,5 % (w/v) Xylose induziert. In 1,5 stündigen Intervallen nach Induktion wurden Proben entnommen, zentrifugiert (13 000 x g, 10 min, 4°C) und mit 100 mM Natriumphosphatpuffer pH 6,8 auf etwa 10⁷ Zellen/ml (\triangleq OD₅₇₈ von 1) eingestellt. Von diesen Proben wurde erneut die OD₅₇₈ bestimmt. Dann wurden sie im Lumineszenzspektrometer (Perkin Elmer, USA) bei 475 nm angeregt und ein Emissionsspektrum von 490-550 nm erstellt, wobei die Spaltweite 5 und die Abtastgeschwindigkeit 500 nm/s betrug. Das Emissionsmaximum entsprach der relativen Fluoreszenz der Probe und wurde in Bezug auf eine OD₅₇₈ von 1 ausgewertet.

3.6.14 *p*-Nitrophenylpalmitat-Assay zur Bestimmung der Aktivität der *Thermobifida fusca* Hydrolase (TFH)

Die Aktivität der *Thermobifida fusca* Hydrolase (TFH) wurde über den *p*-Nitrophenylpalmitat-Assay, der standardmäßig eingesetzt wird, um Hydrolaseaktivität nachzuweisen, bestimmt. Bei der Spaltung von *p*-Nitrophenylpalmitat durch TFH wird das gelbliche *p*-Nitrophenol ($\epsilon_{400\text{nm}, \text{pH } 7,1} = 9,62 \text{ cm}^2 / \mu\text{mol}$) frei, dessen Absorption bei 400 nm detektiert wird. Darüber kann die Enzymaktivität bestimmt werden. Der Assay wurde wie in Yang *et al.*, (2007) beschrieben durchgeführt. Pro Ansatz wurden 960 μl der frisch angesetzten Substratlösung in ein Reaktionsgefäß überführt und in einem Thermoblock (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) auf 30°C vorgewärmt. Dann wurden 40 μl des *B. megaterium* Kulturüberstandes, der bei Bedarf entsprechend mit Natriumphosphatpuffer verdünnt wurde, zugegeben. Die Probe wurde anschließend in eine Plastikküvette überführt und deren Absorptionsänderungen bei 400 nm über einen Zeitraum von 90 Sekunden im Sekundentakt mithilfe eines UV-VIS Spektrometers (Spectrophotometer V-550, Jasco, Gross-Umstadt, Deutschland) gemessen. Über die Änderungen der Absorption pro Minute wurden die Geschwindigkeit der Reaktion und daraus die Enzymaktivität pro ml berechnet.

Lösungen für den *p*-Nitrophenylpalmitat-Assay:

Lösung 1	<i>p</i> -Nitrophenylpalmitat gelöst in 100 % Isopropanol	3 mg/ml
Lösung 2	Natriumphosphatpuffer pH 7,1 Natrium-Taurocholat Gummi arabicum	20 mM 2,3 g/L 1,1 g/L
Substratlösung	Lösung 1 und 2 im Verhältnis 1:10 gemischt	

3.6.15 *Formiat*-Assay zur Bestimmung der Aktivität der *Formiatdehydrogenase* (FDH)

Formiatdehydrogenasen (FDH) wandeln Formiat zu Kohlenstoffdioxid um, wobei NADH freigesetzt wird. Über die spektrometrische Detektion von NADH kann dann die Enzymaktivität der FDH bestimmt werden. Der Assay wurde wie in Bäumchen *et al.*, (2007) beschrieben durchgeführt. Nach dem Zellaufschluss der rekombinanten FDH produzierenden *B. megaterium* Zellen mittels Kugelmöhlenverfahren (3.6.5) wurden 600 μl des Zellextraktes mit 200 μl Natriumacetatpuffer und 100 μl Natriumformiatlösung gemischt. Für den Start der Reaktion wurden 100 μl NAD⁺-Lösung hinzugefügt. Die Freisetzung von NADH ($\epsilon_{320\text{nm}, \text{pH } 5,5} = 6,22 \text{ cm}^2 / \mu\text{mol}$) wurde spektrometrisch (Spectrophotometer V-550, Jasco, Gross-Umstadt, Deutschland) über 90 s bei 320 nm und 30°C gemessen. Über die Absorptionsänderung pro Minute wurde die Reaktionsgeschwindigkeit und daraus die Enzymaktivität pro OD berechnet.

Lösungen für den Formiat-Assay:

Natriumacetatpuffer	Na-Acetat pH 5,5	50 mM
Natriumformiatlösung	Natriumformiat gelöst in Natriumacetatpuffer	2 M
NAD ⁺ - Lösung	NAD ⁺ gelöst in H ₂ O _{MilliQ}	20 mM

3.6.16 Bacterial Two-Hybrid (BACTH) Assay

Die Bacterial Two-Hybrid (BACTH) Untersuchungen zum Nachweis von Protein-Protein Interaktionen wurden von Lisa Suwandhi mithilfe des Kits der Firma Euromedex nach Herstellervorschrift durchgeführt und sind in ihrer Bachelorarbeit ausführlich dargestellt (Suwandhi, 2012).

3.6.17 Förster-Resonanzenergietransfer (FRET)

Für die Protein-Protein Interaktionsuntersuchungen mithilfe des Förster-Resonanzenergietransfers (FRET) wurden zunächst entsprechende *B. megaterium* DSM319 Plasmidstämme bzw. Kontrollstämme kultiviert und die heterologe Genexpression induziert (3.6.1). Nach 6 h erfolgte die Zellernte (3 000 x g, 20 min, 4°C).

Fluoreszenzmessung von YFP und CFP

Die sedimentierten Zellen wurden mit Natriumphosphatpuffer (100 mM, pH 6,8) gewaschen und auf eine OD₅₇₈ von 1 eingestellt. Diese Proben wurden in Quarzküvetten überführt und mithilfe eines Fluorimeters (Jasco TP 8500, Easton, USA) vermessen, wobei die Spaltweite 10 nm und die Abtastgeschwindigkeit 500 nm/min betrug. Die Anregung erfolgte bei 500 nm (für YFP) bzw. 436 nm (für CFP) und das Emissionsspektrum wurde bei 522-600 nm bzw. 460-600 nm aufgenommen. Die Emissionsmaxima bei 535 nm wurden notiert und für die weitere Berechnung verwendet.

Konzentrationsbestimmung von YFP und CFP

Die sedimentierten Zellen wurden in Natriumphosphatpuffer (100 mM, pH 6,8) gewaschen und auf eine OD₅₇₈ von 3 eingestellt. Die lösliche, intrazelluläre Proteinfraction wurde präpariert (3.6.2) und zusammen mit Proben bekannter GFP-Konzentration über SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proteine wurden dann auf eine PVDF Membran (Merck Millipore, USA) übertragen und mithilfe von anti-GFP-Antikörpern detektiert (3.6.11). Die Quantifizierung erfolgte mittels der Software LabQuant (TotalLab Ltd., Newcastle) nach der Rolling ball Methode, wobei die GFP-Proben als Standard dienten. Die erhaltenen YFP und CFP Konzentrationen wurden in die Berechnung von FRET mit einbezogen.

3.6.18 Fluoreszenzmikroskopie

Für die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung wurden Proben aus entsprechenden *B. megaterium* Kulturen 6 h nach Induktion entnommen und sedimentiert (13 000 x g, 10 min, 4°C). Danach wurden die sedimentierten Zellen in Natriumphosphatpuffer (100 mM, pH 6,8) gewaschen und auf eine OD₅₇₈ von 3 eingestellt. 2-5 µl der Probe wurden auf einen Objektträger gebracht und mit einem Deckglas abgedeckt. Die Detektion der Fluoreszenz erfolgte mithilfe des Mikroskops Axiovert 200M (Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland) und der AxioVision Kamera (Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland). Die Fluoreszenzaufnahmen wurden in 630-facher Vergrößerung unter der Verwendung der Filter Sets F36-528 für YFP bzw. F35-544 für CFP gemacht. Zusätzlich wurden die gleichen Bildausschnitte auch im Hellfeld aufgenommen. Die Bilddokumentation erfolgte mit der Software AxioVs20 (Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland).

3.6.19 Co-Kristallisation

Für die Co-Kristallisation wurden die Proteine His-HemC und His-HemD, welche zuvor affinitäts- und gelpermeationschromatographisch gereinigt worden waren, in einem EasyXtal® Pre-Screen Assay (Qiagen®, Hilden, Deutschland) nach der *Hanging-drop* Methode eingesetzt. Der Screen wurde einen Tag vor Versuchsbeginn in die Anaerobenbox (MACS-MG-1000 anaerobic workstation) bei 17°C eingeschleust und immer wieder geöffnet, damit noch in den Flüssigkeiten vorhandene Sauerstoff entweichen konnte. Der Screen bietet 24 Reservoirs mit verschiedenen Pufferbedingungen, wobei jedes Reservoir mit einem Schraubverschluss, der insgesamt 6 Wells beinhaltet, versehen ist. Pro Well wurden verschiedenen Konzentrationen der Proteine bzw. verschiedene Zusammensetzungen der Komponenten pipettiert (Tab. 13). Die Reservoirs wurden mit dem so beladenen Schraubverschluss verschlossen. Anschließend wurde der Screen in regelmäßigen Abständen unter dem Mikroskop (Digital Microscope VHX 500F, Keyence, Hannover) betrachtet.

Tab. 13: Zusammensetzung der Pre-Screen Ansätze pro Well. *Das Porphobilinogen (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) wurde im His-HemD-Ansatz gelöst. **Puffer (50 mM Tris pH 8,4, 500 mM NaCl). Dieser Puffer wurde auch für die Proteinverdünnungen verwendet.

Well	His-HemC (je 1 µl)	His-HemD (je 1 µl)	Porphobi- linogen	Reservoir- flüssigkeit	Puffer**
1	600 µM (≈20 mg/ml)	600 µM (≈20 mg/ml)	24 mM*	2 µl	-
2	-	-	-	1 µl	1 µl
3	300 µM (≈10 mg/ml)	300 µM (≈10 mg/ml)	12 mM*	2 µl	-
4	300 µM (≈10 mg/ml)	-	12 mM*	1 µl	-
5	150 µM (≈5 mg/ml)	150 µM (≈5 mg/ml)	6 mM*	2 µl	-
6	-	300 µM (≈10 mg/ml)	-	1 µl	-

Da sich im Pre-Screen Assay mit den Zusätzen 30 % (w/v) PEG 4000 bzw. PEG 8000 und bei 100 mM Tris-HCl pH 8,5 mit 2 M Ammoniumsulfat kristallähnliche Strukturen zeigten, wurden zwei Verfeinerungsscreens nach der *Hanging-drop* Methode in 24-Well-Platten (VDX-Platten, Hampton

Research, USA) jeweils anaerob bei 17°C und aerob bei 4°C angesetzt. Im ersten Verfeinerungsansatz wurden verschiedene PEG Arten (PEG 600, 1000, 4000, 8000) in unterschiedliche Konzentrationen (10 %, 15 %, 30 %, 45 % (w/v)) getestet. Im zweiten wurde der pH Wert des 100 mM Trispuffers (pH 8, pH 8,4, pH 9, pH 9,5) und die Konzentration des zugesetzten Ammoniumsulfats (0,5 M, 1 M, 1,5 M, 2 M, 2,5 M) variiert. 1 ml der verschiedenen Puffer wurde pro Well pipettiert, während auf einem runden Glasplättchen die Komponenten wie in Tabelle 13 (Well 3) beschrieben gemischt wurden. Das Glasplättchen wurde dann mit dem Tropfen nach unten auf die am Rand mit Silikon bestrichenen Wells gelegt.

Des Weiteren wurde ein Index Screen (Hampton Research, CA, USA) anaerob bei 17°C und aerob bei 4°C nach der *Sitting-drop* Methode angesetzt. Hierbei waren bereits je 50 µl der Reservoirflüssigkeiten vorgelegt worden (Dr. Peer Lukat, HZI, Braunschweig). In das dafür vorgesehene Well wurde pro Reservoir 1 µl Reservoirflüssigkeit, 0,5 µl His-HemD (300 µM) mit 12 mM Porphobilinogen (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) und 0,5 µl His-HemC (300 µM) pipettiert. Anschließend wurde die Platte Reihe für Reihe mit Tesafilm verschlossen.

In Kooperation mit Dr. Peer Lukat wurden noch weitere Pufferbedingungen mithilfe verschiedener Screens (JCSG Core I-IV, Protein Complex (Qiagen, Hilden, Deutschland), Migas, Index (Hampton Research, USA) und Morpheus (Gorrec, 2009)) nach der *Sitting-drop* Methode getestet. Durch den Pipettierroboter Honeybee 961 (Zinsser Analytic, Deutschland) wurden je 1 µl der Protein/Porphobilinogenlösung mit 1 µl der Reservoirflüssigkeit pipettiert. Pro Reservoir standen drei Wells zur Verfügung. So wurden drei verschiedene Proteinkonzentrationen (2,5 mg/ml, 5 mg/ml und 10 mg/ml pro Protein) getestet, wobei beide Proteine äquimolar und das Porphobilinogen in 40-fachen molaren Überschuss eingesetzt wurden. Alle Screens wurden in regelmäßigen Abständen auf Kristallbildungen überprüft.

3.6.20 Co-Immunopräzipitation (Co-IP)

Für die Co-Immunopräzipitation (Co-IP) wurde der Pierce® Crosslink Magnetic IP/Co-IP Kit der Firma Thermo Scientific (Dreieich, Deutschland) eingesetzt. Das Experiment teilt sich in mehrere Schritte: Herstellung des einzusetzenden Zellextraktes, Beladung der Magnetic Beads (MB) mit Antikörpern (Ak), Crosslinken der gebundenen Ak, Beladung der präparierten MBs mit Zellextrakt und Elution der gebundenen Proteine. Die Co-IP wurde immer in sechs parallelen Ansätzen durchgeführt. Wenn nicht anders vermerkt wurden die Vorschriften des Herstellers befolgt.

Herstellung des einzusetzenden Zellextraktes

B. megaterium DSM509 wurde in einem Gesamtvolumen von 1 l kultiviert (3.4.2), wobei 3 h, 4,5 h und 6 h nach dem Animpfen 300 µM Aminolävulinsäure (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) zugegeben wurde. Nach 6,5 h wurden die Zellen geerntet (4 000 x g, 20 min, 4°C). Die sedimentierten Zellen wurden in Waschpuffer resuspendiert und anschließend durch Ultraschallbehandlung

aufgeschlossen (3.6.4). Um die Proteine im Zelllysats zu stabilisieren, wurde zusätzlich ein Proteaseinhibitormix (cOmplete, Mini, EDTA free, Roche, Basel, Schweiz) zugesetzt. Durch Zentrifugation (13 000 x g, 30 min, 4°C) wurden die Zelltrümmer entfernt und der Überstand für die Co-IP eingesetzt.

Waschpuffer	Tris-HCl pH 7,4	25 mM
	NaCl	150 mM
	Glycerin	5 %

Beladung der Magnetic Beads (MB) mit Antikörpern (Ak)

Pro Eppendorfgefäß wurden 500 µg MB eingesetzt, welche mit 20 µg gereinigtem 6A1 anti-HemD Antikörper beladen wurden. Es wurde nach den Vorschriften des Herstellers vorgegangen, wobei die Inkubation der MBs mit den Antikörpern auf 2 h ausgedehnt wurde.

Crosslinken der gebundenen Ak

Das Crosslinken erfolgte wie im Manual beschrieben mit der Änderung, dass die Schritte Nr. 6 und Nr. 7, die zur Entfernung der nicht-gecrosslinkten Antikörper dienten, jeweils zweimal durchgeführt wurden.

Beladung der präparierten MBs mit Zellextrakt und Elution der gebundenen Proteine

Pro Eppendorfgefäß mit den präparierten MBs wurde 500 µl des entsprechenden Zellextrakts zugegeben und üN bei 4°C rollend (Rollentaumler, Ingenieurbüro CAT) inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Ansätze rollend 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann erfolgte die Zugabe von 20 µM Porphobilinogen (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland). Nach 10-minütiger Inkubation wurde die MBs magnetisch abgetrennt, um den Überstand zu entfernen. Die darauffolgende 1-stündige Inkubation mit 500 µl des entsprechenden Zellextrakts bei Raumtemperatur und die Zugabe von 20 µM Porphobilinogen (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) 10 Minuten vor Abtrennung des Überstands wurde dreimal wiederholt. Danach wurden die MBs einmal mit 500 µl IP Lyse-/Waschpuffer (Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland) versetzt mit 20 µM Porphobilinogen und einmal mit 500 µl MilliQ versetzt mit 20 µM Porphobilinogen gewaschen. Die Elution erfolgte wie vom Hersteller empfohlen, allerdings wurde das doppelte Volumen an Elutionspuffer und Neutralisationspuffer (beides Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland) eingesetzt. Die Elutionsfraktionen aller Ansätze wurden vereinigt und mittels Amicon® Zentrifugenröhrchen (Merck Millipore, Dortmund, Deutschland) aufkonzentriert. Das Konzentrat wurde anschließend via Western Blot (3.6.11) analysiert.

3.6.21 Pulldown

Zunächst wurden die entsprechenden *E. coli* Plasmidstämme (*E. coli* BL21 (DE3) StarTM pLysS transformiert mit pET-Duet1-*hishemC-hemD* bzw. pETDuet1-*hemD*) in 100 ml LB-Medium versetzt mit entsprechenden Antibiotika (Amp, Cm) aerob schüttelnd (250 rpm) kultiviert (3.4.2). Bei einer OD₅₇₈ von 0,8 wurde die Genexpression mit 400 µM IPTG induziert, die Kultur zu 17°C geshiftet und aerob weiter inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Kulturen mit 300 µM Aminolävulinsäure versetzt und nach 1 h geerntet (4000 x g, 20 min, 4°C). Die sedimentierten Zellen wurden je in 2,5 ml Bindepuffer resuspendiert, mit 16 U/ml Bezonase versetzt und per Ultraschallbehandlung (3.6.4) aufgeschlossen. Danach wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugation (13 000 x g, 30 min, 4°C) entfernt und der zellfreie Extrakt auf die Affinitätssäulen gegeben. Diese war wie in 3.6.6 beschrieben präpariert worden, jedoch wurde hier nur je 300 µl Chelating Sepharose Fast Flow (GE Healthcare, GB) als Matrix eingesetzt und anstelle von Nickelsulfat 100 mM Kobaltsulfat für die Funktionalisierung verwendet. Nach der Passage des Zellextraktes wurden die Säulen mit je 5 SV Bindepuffer, Waschpuffer-1 und Waschpuffer-2 gewaschen. Die Elution der Proteine erfolgte über 3 SV Elutionspuffer, wobei je 300 µl aufgefangen und anschließend über Western Blot analysiert wurden.

Lösungen für den Pulldown-Assay:

Bindepuffer	Hepes pH 7,5	50 mM
	NaCl	500 mM
	MgCl ₂	10 mM
	Imidazol	10 mM
Waschpuffer-1 = Bindepuffer, aber	Imidazol	50 mM
Waschpuffer-2 = Bindepuffer, aber	Imidazol	100 mM
Elutionspuffer = Bindepuffer, aber	Imidazol	400 mM

3.6.22 Proteomanalyse

Die *B. megaterium* Stämme (MS941 transformiert mit pFDH.opti und MS941 transformiert mit pFDH.opti_AlaArg) wurden kultiviert und die heterologe Genexpression induziert (3.6.1). Bei einer OD₅₇₈ 3 wurden die Zellen geerntet (3 000 x g, 20 min, 4°C) und bei -80°C eingefroren. Diese Proben wurden an Dr. Martin Kucklick übergeben, welcher sie nach Standardmethoden bearbeitet und der massenspektrometrischen Analyse unterzogen hat. Im Folgenden ist das Vorgehen kurz zusammengefasst:

Zunächst wurden die Zellen aufgeschlossen und die Proteine mittels Aceton präzipitiert. Anschließend wurden die Proteine über SDS-PAGE aufgetrennt und ihre Konzentration im Gel pro

Bahn über das Programm AIDA Image Analyzer (Raytest, Straubenhardt, Deutschland) bestimmt. Jede Bahn wurde in 8 Stücke, die jeweils die gleiche Proteinkonzentration hatten, geteilt, die Stücke in kleine Würfel zerschnitten und alle Würfel pro Gelstück in je ein Reaktionsgefäße überführt (insgesamt 8 Gefäße pro Bahn). Nach dem Verdau mit Trypsin wurden die Peptide extrahiert und über reversed-phased C₁₈ ZipTips (Millipore, Bedford, USA) entsalzt. Anschließend wurden sie über eine UPLC (Waters nanoAquity) gekoppelt an einen Orbitrap velos pro Massenspektrometer (Thermo Scientific) analysiert. Die erhaltenen Daten wurden über die Programme Mascot (Matrix Science Ltd., UK) und Scaffold (Searle, 2010) ausgewertet.

3.6.23 Bionformatische Analyse

Die Identifizierung der Anzahl und Position der *tRNA*-Gene im Genom von *B. megaterium* DSM319 wurde von Dr. Boyke Bunk mithilfe des Programmes tRNAscan-SE durchgeführt (Lowe & Eddy, 1997). Auch die Auflistung der Codonanzahlen in allen ORFs des *B. megaterium* Genoms wurde von Dr. Boyke Bunk bereitgestellt.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Rekombinante Proteinproduktion, Codongebrauch und *tRNA* Coexpression in *Bacillus megaterium*

In den letzten Jahren wurde *B. megaterium* als Produktionswirt stetig verbessert. So wurden verschiedene Klonierungsvektoren basierend auf dem nativen Xylose-induzierbaren Promotorsystem etabliert, um Proteine kontrolliert und mit unterschiedlichen Tags zu produzieren (Rygus & Hillen, 1991; Malten *et al.*, 2005a; Biedendieck *et al.*, 2007a). Durch die weitere Optimierung des Promotorsystems konnte die Expression von heterologen Genen verstärkt und damit der Ertrag an rekombinanten Proteinen weiter gesteigert werden (Stammen *et al.*, 2010a). Allerdings können trotz starkem Promotor Limitierungen bei der Translation auftreten, wenn sich die Codonzusammensetzung der abzulesende mRNA stark vom Codongebrauch des Wirtes unterscheidet. In *E. coli* führen insbesondere Cluster von selten vorkommenden Codons zu vorzeitigem Aminosäurekettenabbruch (Rosenberg *et al.*, 1993), falschem Einbau von Aminosäuren (Calderone *et al.*, 1996) oder Frameshifts (Spanjaard & van Duin, 1988).

In unserer Arbeitsgruppe untersuchte Martin Gamer, ob diese Problematik auch für die rekombinante Proteinproduktion in *B. megaterium* zutrifft. Die zu diesem Zeitpunkt noch vorläufigen Genomdaten von *B. megaterium* DSM319 wurden herangezogen, um die Häufigkeit der vorkommenden Codons zu berechnen (Grote *et al.*, 2005). Es stellte sich heraus, dass unter anderem die Codons der Aminosäuren Alanin (GCC), Arginin (CGG), Threonin (ACC), Serin (UCC) und Leucin (CUC) nur mit einer Häufigkeit < 1 % genutzt wurden. Um den Effekt dieser selten vorkommenden Codons im Vergleich zu den häufig vorkommenden Codons der jeweiligen Aminosäure auf die rekombinante Proteinproduktion zu testen, wurde ein GFP-Codontestsystem etabliert (Gamer, 2009). Als Testprotein wurde das grünfluoreszierende Protein (GFP) eingesetzt. Es lässt sich auch in intakten Zellen leicht über Fluoreszenzmessungen quantifizieren. Zudem kann über die GFP Produktion auf die Translationseffizienz rückgeschlossen werden, da die Fluoreszenzintensität mit dem mRNA Level korreliert (Kudla *et al.*, 2009). Rosenberg und Kollegen hatten beobachtet, dass sich die Codonzusammensetzung im 5'-Bereich der mRNA stark auf die Translationseffizienz auswirkt (Rosenberg *et al.*, 1993). Daher wurde im 5'-Terminus des *gfp*-Gens je ein Cluster aus vier selten bzw. vier häufig vorkommenden Codons einer Aminosäuren inseriert. Diese Varianten des *gfp*-Gens wurden unter die Kontrolle des nativen Xylose-induzierbaren Promotors P_{xyIA} in den Shuttlevektor pMM1522 (Malten *et al.*, 2006) kloniert (Abb. 13).

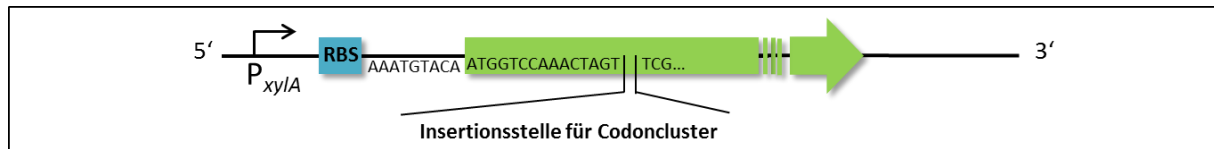


Abb. 13: Schematische Darstellung der genetischen Elemente des plasmidbasierten Codontestsystems (verändert nach Gamer, (2009)). Der Xylose-induzierbare Promotor ist durch einen schwarzen Pfeil (P_{xylA}) dargestellt, darauf folgt die Ribosomenbindestelle (RBS, blaue Box). Der Open Reading Frame (ORF) des *gfp*-Gens ist durch einen grünen Pfeil dargestellt und die Insertionsstelle der Codoncluster (vier identische aufeinanderfolgende selten bzw. häufig vorkommende Codons) ist gekennzeichnet. Die verschiedenen Vektoren wurden in *B. megaterium* eingebracht, die Stämme kultiviert und die Produktion des GFP bei einer OD von 0,4 mit 0,5 % Xylose induziert. Nach 6 h wurden Proben entnommen und die relative Fluoreszenz als Maß der GFP Menge bestimmt.

Durch den Vergleich der Menge an produziertem GFP wurde bestätigt, dass Cluster von seltenen Codons auch in *B. megaterium* zu Translationsschwierigkeiten führen, da in allen untersuchten Fällen eine geringere GFP Menge produziert wurde als im Pedant mit inserierten favorisierten Codons (Gamer, 2009). In *E. coli* wurde die zu geringe Verfügbarkeit von entsprechenden tRNAs als Ursache für die schlechtere Translationseffizienz bei Clustern von selten vorkommenden Codons identifiziert (Spanjaard *et al.*, 1990), da die Häufigkeit vorkommender Codons mit der Konzentration der zugehörigen tRNA korreliert (Ikemura, 1981). Wird dieses Gleichgewicht durch die Produktion von rekombinanten Proteinen, deren kodierende mRNA nicht an den Codongebrauch des entsprechenden Wirts angepasst ist, gestört, kommt es zu den oben erwähnten negativen Effekten bei der Translation. Im Falle des Produktionswirtes *E. coli* wurde dieser Engpass durch die Konstruktion von Expressionsvektoren behoben, die eine zusätzliche Expression von in *E. coli* selten vorkommenden *tRNA*-Genen vermittelt (Novy *et al.*, 2001; Carstens *et al.*, 2001). Es sollte nun untersucht werden, ob es möglich ist, durch zusätzliche Expression von in *B. megaterium* selten vorkommenden *tRNAs* die Ausbeute an rekombinant produziertem Protein auch in diesem Wirt zu steigern. So war der erste Schritt, alle *tRNA*-Gene im *B. megaterium* Genom zu identifizieren.

4.1.1 Bioinformatische Identifikation von *tRNA* Genen im *B. megaterium* Genom

Die Sequenzierung und Annotation des Genoms von *B. megaterium* DSM319 war im Jahr 2011 im Rahmen des SFB 578 abgeschlossen worden (Eppinger *et al.*, 2011). Somit war die Voraussetzung geschaffen, alle *tRNA*-Gene zu identifizieren und ihre Lage im Genom zu bestimmen. Mithilfe des Programms tRNAscan-SE (Lowe & Eddy, 1997) wurden insgesamt 115 *tRNA*-Gene identifiziert, die für 31 unterschiedliche Anticodonspezies kodieren (Bunk, 2011). Sie sind in 13 Operon-ähnlichen Strukturen organisiert, wobei die Anzahl aufeinanderfolgender *tRNA*-Gene variiert und auch identische *tRNA*-Gene in einem Operon vorkommen können (Tab. 14, Spalte 4, A-M). Sieben *tRNA*-Gene liegen einzeln im Genom vor (Tab. 14, Spalte 4, I-VIIe). Diese Verteilung weist eine große Ähnlichkeit mit der in *B. subtilis* auf. Hier sind die insgesamt 86 *tRNA*-Gene, die 33 Anticodonspezies kodieren, in 11 transkriptionale Einheiten zusammengefasst, und 8 Gene liegen einzeln im Genom vor (Moszer *et al.*, 1999). Die Anzahl von *tRNA*-Genen innerhalb bakterieller Genome kann abhängig

von der Genomgröße von 30 bis über 120 betragen (Higgs & Ran, 2008), wobei sich in sehr großen Genomen häufig multiplizierte *tRNA*-Gene finden. Auch im *B. megaterium* Genom konnten zwischen 2-12 identische *tRNA*-Genkopien identifiziert werden (Tab. 14, Spalte 3). Da die Konzentration der *tRNAs* im Organismus durch die Stärke des entsprechenden Promotors limitiert ist (Nomura & Morgan, 1977), wird durch die Multiplikation die Konzentration der entsprechenden *tRNAs* erhöht. Experimentell wurde dies für *B. subtilis* nachgewiesen, dessen *tRNA*-Konzentrationen mit den entsprechenden *tRNA*-Genkopienzahlen korrelieren (Kanaya *et al.*, 1999).

Bereits in den 80er Jahren wurde festgestellt, dass die *tRNA*-Konzentration zudem mit dem Vorkommen des korrespondierenden Codons korreliert, indem die *tRNA*-Konzentrationen in *E. coli* bestimmt und über einige bekannte *E. coli* Gene die Häufigkeit der vorkommenden Codons ermittelt worden war (Ikemura, 1981). Übereinstimmend wurde auch im *B. megaterium* Genom für selten vorkommende Codons mit einer Häufigkeit < 1 %, (Kane, 1995) meist entweder eine Genkopie der zugehörigen *tRNA* z.B. bei Leu (CUC), Ser (UCC) oder Arg (CGG) bzw. keine z.B. bei Ser (UCG), Arg (CGC) oder Gly (GGG) gefunden. Für häufiger (> 1 %) vorkommenden Codons konnten entsprechend mehrere Genkopien, z.B. 5 bei Arg (CGU, 1,1 %), 5 bei Thr (ACA, 2,25 %) oder 6 bei Val (GUA, 2,66 %) (Tab. 14, vgl. Spalte 2 und 3) identifiziert werden. Ausnahmen stellen jedoch diejenigen Codons dar, die über den Wobble-Mechanismus bzw. speziell modifizierte *tRNAs* bedient werden, da für diese keine exakt entsprechende *tRNA* kodiert ist, obwohl sie relativ häufig vorkommen, wie z.B. Leu (CUU, 2,36 %) oder Pro (CCU, 1,4 %). Konträr tritt in *B. megaterium* auch der Fall auf, dass für synonyme Codons, die eigentlich eher selten verwendet werden, mehrere entsprechende *tRNA*-Genkopien vorliegen z.B. 4 bei Phe (UUC, 0,94 %) (Tab. 14, vgl. Spalte 2 und 3).

In den meisten bakteriellen Genomen werden zweifach degenerierte Codons von einer *tRNA* bedient (Ran & Higgs, 2010). Wenn sich an der 3' Position des Codons ein U oder C befindet, wird die *tRNA* verwendet, deren Anticodon ein G an der Wobble-Position (N_{34}) besitzt. So kann es mit beiden Codons paaren. Ähnlich verhält es sich mit Codons, die an der 3' Position ein A oder G haben. Hier befindet sich ein U an der Wobble-Position des Anticodons (N_{34}) und ermöglicht das Paaren mit beiden Codons. Normalerweise wird hier das Codon NNA bevorzugt verwendet, weil die Paarung zwischen A und U aufgrund der höheren Affinität schneller erfolgt als zwischen G und U (Sorensen & Pedersen, 1991) und damit eine schnellere Translation gewährleistet wird. Diese Regelmäßigkeit ist auch für *B. megaterium* zu beobachten (Tab. 14, Spalte 2: Häufigkeit von NNA>NNG für entsprechende Aminosäure).

Obwohl Prolin (4) und Isoleucin (3) durch mehrere synonyme Codons verschlüsselt werden, existiert auch hier jeweils nur eine *tRNA* (Tab. 14, Spalte 6). Es ist bekannt, dass Wobble-U im Anticodon durch eine bestimmte Modifikation mit allen vier Nukleotiden paaren kann (Agris, 1991). So wird die Paarung mit allen vier Prolin Codons ermöglicht. Im Falle von Isoleucin paaren die Codons AUU und

AUC mit dem Anticodon GAU der Ile-tRNA, während das 3. Ile-Codon, AUA, aller Wahrscheinlichkeit nach von einer entsprechend modifizierten Met-tRNA bedient wird, wie es bereits für andere Prokaryoten gezeigt wurde (Köhler *et al.*, 2014). Die anderen vierfach degenerierten Codons werden von zwei Isoakzeptoren bedient, während Leu, Ser und Arg durch jeweils 6 synonyme Codons kodiert sind und 3 bzw. 4 Isoakzeptoren besitzen (Tab. 14, Spalte 6). Auffällig ist, dass tRNAs mit Wobble-C seltener kodiert sind (4 Anticodungspezies), als jene mit Wobble-U (12 Anticodungspezies) oder G (14 Anticodungspezies), was damit zusammenhängt, dass C nur mit G paart. Diese Eigenschaft ist jedoch im Falle der Aminosäuren Methionin und Tryptophan essentiell, da diese nur durch ein Codon verschlüsselt werden (Tab. 14, Spalte 2 und 3).

Wie bereits erwähnt, besteht ein Zusammenhang zwischen der tRNA-Konzentration bzw. tRNA-Genkopienzahl und der Häufigkeit des zugehörigen Codons (Ikemura, 1981). Für *B. megaterium* ist zusätzlich eine Tendenz auszumachen, dass Aminosäuren, die häufig verschlüsselt sind auch mehr Isoakzeptorgenen besitzen. Leucin, die am häufigsten (9,98 %) verschlüsselte Aminosäure, besitzt 10 Isoakzeptorgenenkopien, während Prolin mit einer Häufigkeit von 3,58 % nur 3 Isoakzeptorgenenkopien hat (Tab. 14, Spalte 1 und 5). Gegenläufig dazu weist allerdings Methionin 12 Isoakzeptorgene auf, obwohl diese Aminosäure nur mit einer Häufigkeit von 2,68 % vorkommt. Der Grund für diese Abweichung könnte in der Sonderrolle liegen, die fMet als Initiator-tRNA einnimmt. Da jede Translation mit diesem Schritt beginnt, ist eine gleichbleibend hohe Konzentration dieser tRNA wichtig, damit die Translationseffizienz nicht eingeschränkt wird. Auch im Falle von Arginin, das mit einer Häufigkeit von 3,77 % vorkommt, erscheint eine Isoakzeptorgenanzahl von 7 hoch. Zusätzlich weicht auch die Zusammensetzung der synonymen Codons für diese Aminosäure ab. Grundsätzlich finden sich unter den synonymen Codons höchstens zwei als selten klassifizierte Codons im *B. megaterium* Genom (Tab. 14, Spalte 2), Arginin jedoch besitzt fünf Codons, die eine Häufigkeit < 1 % aufweisen. Darüber hinaus wird auch eines dieser Codons von einer seltenen C-Wobble-tRNA bedient. All diese Auffälligkeiten könnten wie bei Met-tRNA auf eine Sonderrolle einer oder mehrerer Arg-tRNAs hindeuten.

Tab. 14: Analyse der Codonhäufigkeit und Vorkommen von korrespondierenden *tRNA*-Genen im Genom von *B. megaterium* DSM319. Spalte 1: Aminosäurehäufigkeit. Um diese zu ermitteln, wurde die Häufigkeiten der synonymen Codons addiert und durch die Gesamtzahl der Codons in allen Open Reading Frames (ORFs) geteilt. Spalte 2: synonyme Codons. Die Anzahl des jeweiligen Codons wurde in allen ORFs gezählt und dann durch die Codongesamtanzahl aller ORFs geteilt. Fett gedruckt: alle Codons mit einer Häufigkeit < 1 %. Hellgrau bzw. dunkelgrau unterlegt: selten vorkommende Codons bzw. häufig vorkommende Codons, die im Codontestsystem untersucht worden sind (diese Arbeit und Gamer (2009)). Spalte 3: Anzahl der *tRNA*-Gene. Die *tRNA*-Gene wurden mit Hilfe des Programmes tRNAscan-SE bestimmt. Hellgrau unterlegt: *tRNA*-Gene, deren Coexpression in dieser Arbeit untersucht wird. Spalte 4: Lage der *tRNA*-Gene. A: 2er-Operon, Position 10797-10966; B: 2er-Operon, Pos. 214942-215098; C: 2er-Operon, Pos. 72524-72366; D: 7er-Operon, Pos. 158916-159504; E: 7er-Operon, Pos. 3444955-3444290; F: 3er-Operon, Pos. 2191962-2192234; G: 4er-Operon, Pos. 5075295-5074945; H: 5er-Operon, Pos. 4351930-4351482; I: 9er-Operon, Pos. 34838-35619; J: 11er-Operon, Pos. 208872-209939; K: 17er-Operon, Pos. 403504-405156; L: 19er-Operon, Pos. 588736-590368; M: 20er-Operon, Pos. 4729715-4727904. Die Zahlen hinter den Buchstaben geben an, wie viele identische *tRNA*-Gene im selben Operon zu finden sind. e: einzeln im Genom vorliegend. Die römischen Zahlen vor „e“ geben die Position der Gene an. I: Pos. 21714-21806; II: Pos. 4858039-4857968; III: Pos. 4526870-4526797; IV: Pos. 2394791-2394720; V: Pos. 3772809-3772737; VI: Pos. 730124-730195; VII: Pos. 445106-445182. Spalte 5: Summe aller Isoakzeptorgene (Summe aller *tRNA*-Gene aus Spalte 3). Spalte 6: Anzahl der Isoakzeptoren (\cong Summe verschiedener *tRNA*-Gene aus Spalte 3).

Aminosäure (Häufigkeit [%])	Codons (Häufigkeit [%])	Anzahl der <i>tRNA</i> -Gene (Anticodon)	Organisation	Gesamtanzahl der Isoakzeptor- gene	Anzahl der Isoakzep- toren
Leucin (9,89)	CUU (2,36)	-	-	10	4
	CUC (0,49)	1 (GAG)	J		
	CUG (1,05)	-	-		
	CUA (1,09)	5 (UAG)	I, J, F, M, E		
	UUG (1,16)	1 (CAA)	K		
	UUA (3,75)	3 (UAA)	I, K, M		
Serin (6,33)	UCU (1,65)	-	-	9	3
	UCC (0,48)	1 (GGA)	K		
	UCG (0,57)	-	-		
	UCA (1,52)	5 (UGA)	Ie, L, M, H, E		
	AGU (1,00)	-	-		
	AGC (1,12)	3 (GCU)	J, M, E		
Arginin (3,77)	CGU (1,10)	5 (ACG)	I, J, L, M, E	7	3
	CGC (0,77)	-	-		
	CGG (0,21)	1 (CCG)	Ile		
	CGA (0,70)	-	-		
	AGG (0,20)	-	-		
	AGA (0,80)	1 (UCU)	IIIe		
Alanin (7,27)	GCU (2,65)	-	-	6	2
	GCC (0,85)	1 (GGC)	IVe		
	GCG (1,23)	-	-		
	GCA (2,53)	5 (UGC)	A, I, D, L, M		
Threonin (5,51)	ACU (1,00)	-	-	6	2
	ACC (0,63)	1 (GGU)	Ve		
	ACG (1,64)	-	-		
	ACA (2,25)	5 (UGU)	I, D, K, L, M		
Glycin	GGU (1,73)	-	-	10	2

Aminosäure (Häufigkeit [%])	Codons (Häufigkeit [%])	Anzahl der <i>tRNA</i> -Gene (Anticodon)	Organisation	Gesamtanzahl der Isoakzeptor- gene	Anzahl der Isoakzep- toren
(6,76)	GGC (1,37)	6 (GCC)	I, D, K, L, F, M		
	GGG (0,86)	-	-		
	GGA (2,79)	4 (UCC)	J, K, L, M		
Valin (7,37)	GUU (2,42)	-	-	7	2
	GUC (0,83)	1 (GAC)	VIe		
	GUG (1,46)	-	-		
	GUA (2,66)	6 (UAC)	I, D, J, K, L, M		
Prolin (3,58)	CCU (1,40)	-	-	3	1
	CCC (0,26)	-	-		
	CCG (0,79)	-	-		
	CCA (1,09)	3 (UGG)	I, L, M		
Isoleucin (7,35)	AUU (5,03)	-	-	4	1
	AUC (1,49)	4 (GAU)	A, L, M, E		
	AUA (1,01)	-	-		
Methionin (2,68)	AUG (2,68)	12 (CAU)	B, K, VIIe, L2, M2,H2, E2, C	12	1
Tyrosin (3,58)	UAU (2,46)	-	-	3	1
	UAC (1,12)	3 (GUA)	D, K, L		
Cystein (0,75)	UGU (0,46)	-	-	1	1
	UGC (0,29)	2 (GCA)	D, K		
Tryptophan (1,02)	UGG (1,02)	2 (CCA)	K, F	2	1
Phenylalanin (4,55)	UUU (3,61)	-	-	4	1
	UUC (0,94)	4 (GAA)	K, L, G, M		
Asparagin (4,16)	AAU (2,61)	-	-	6	1
	AAC (1,56)	6 (GUU)	J, K, L, M, H2		
Lysin (7,1)	AAG (1,68)	-	-	6	1
	AAA (5,42)	6 (UUU)	I, D, J, L, G, M		
Asparaginsäure (4,73)	GAU (3,39)	-	-	6	1
	GAC (1,34)	6 (GUC)	J, B, K, L, G, M		
Glutaminsäure (7,16)	GAG (1,62)	-	-	6	1
	GAA (5,55)	6 (UUC)	J, K, L, G, M, C		
Histidin (2,28)	CAU (1,55)	-	-	3	1
	CAC (0,72)	3 (GUG)	K, L, M		
Glutamin (4,01)	CAG (1,41)	-	-	4	1
	CAA (2,60)	4 (UUG)	D, J, K, L		

4.1.2 Untersuchung zur tRNA Coexpression mit dem GFP-Codontestsystem

Nachdem mit Hilfe des Codontestsystems (Abb. 13) gezeigt werden konnte, dass selten vorkommende Codons von Ala (GCC), Arg (CGG), Thr (ACC), Ser (UCC) und Leu (CUC) einen negativen Einfluss auf die GFP Produktion hatten (diese Arbeit und Gamer, 2009), wurde nun untersucht, ob die zusätzliche Expression der entsprechenden *tRNA* diesen Effekt mindern oder sogar ausgleichen kann. Zudem sollte zusätzlich festgestellt werden, ob die Coexpression dieser *tRNA* auch zu einem Unterschied in der GFP Produktion führt, wenn das *gfp*-Gen Insertionen der entsprechenden häufig vorkommenden Codons, Ala (GCU), Arg (CGU), Thr (ACA), Ser (UCA) und Leu (UUA), aufweist.

4.1.2.1 Klonierung der tRNA-Gene in Vektoren des GFP-Codontestsystems

Bei den tRNA supplementierten *E. coli* Stämmen wird das zu exprimierende heterologe Gen über einen Standardvektor eingeschleust, während seltenen *tRNA*-Gene unter der Kontrolle ihrer nativen Promotoren auf einem zweiten Vektor in den Organismus eingebracht werden. In Vorversuchen hatte sich jedoch gezeigt, dass die Cotransformation von *B. megaterium* mit zwei Vektoren nicht immer gut funktionierte (Bendig, 2007). Zudem kann der rekombinante Proteinertrag beeinträchtigt werden, wenn die Zellen auf Medium wachsen, das mit zwei Antibiotika supplementiert ist. Daher sollten die entsprechende *tRNA*-Gene in die bereits vorhandenen Vektoren des GFP-Codontestsystems kloniert werden (schematisch dargestellt in Abb. 14).

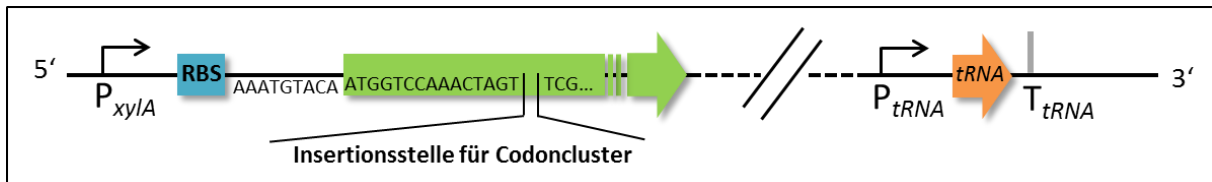


Abb. 14: Schematische Darstellung der Erweiterung des GFP-Codontestsystems um ein entsprechendes tRNA-Gen. Die Expression des *gfp*-Gens (grüner Pfeil) steht unter der Kontrolle des nativen Xylose-induzierbaren Promotors (schwarzer Pfeil, P_{xylA}). Die Insertionsstelle, in die vier identische aufeinanderfolgende Codons „in frame“ eingefügt wurden, ist markiert. Blaue Box: Ribosomenbindestelle (RBS). Das entsprechende *tRNA*-Gen (oranger Pfeil) wurde mit putativem nativem Promotor (schwarzer Pfeil, P_{tRNA}) und putativem nativem Terminator (grauer Strich, T_{tRNA}) einkloniert. Das entsprechende *tRNA*-Genprodukt überträgt die Aminosäure, für die das eingefügte Codoncluster im *gfp*-Gen kodiert.

Hierfür boten sich folgende Restriktionsstellen innerhalb des Vektors an: AflIII, NaeI/EagI und AatII (Abb. 15). Diese Schnittstellen waren bereits für andere Klonierungen in früheren Arbeiten genutzt worden und hatten sich als geeignet erwiesen (Malten *et al.*, 2005b; Biedendieck, 2006). Da bei den *E. coli* tRNA-Plasmiden wie z.B. pRIG die *tRNA*-Gene unter der Kontrolle der entsprechenden nativen tRNA-Promotoren stehen (Baca & Hol, 2000) und in Vorversuche mit *B. megaterium* gezeigt wurde, dass bessere Ergebnisse mit dem nativen tRNA-Promotor als mit einem induzierbaren Promotor erzielt werden konnten (Bendig, 2007), wurden die *tRNA*-Gene zusammen mit ihrem eigenen Promotor einkloniert.

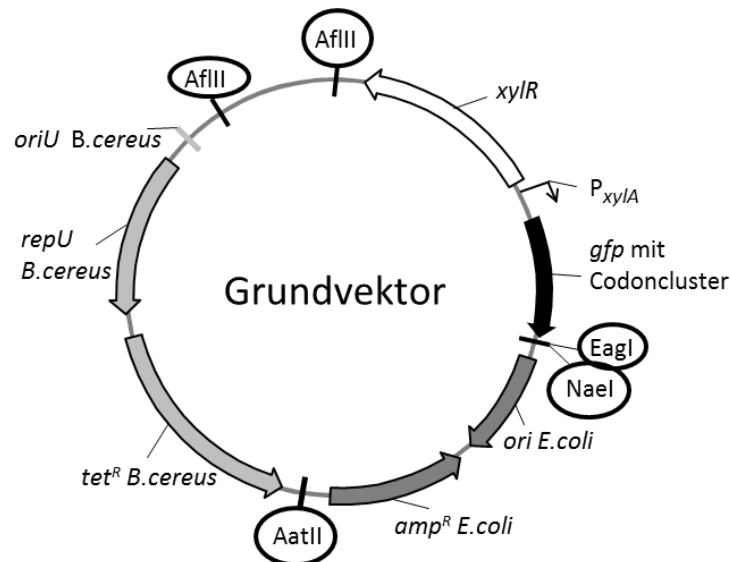


Abb. 15: Aufbau aller Vektoren für das erweiterte GFP-Codontestsystem. Alle Vektoren basieren auf dem Shuttlevektor pMM1522 (Malten *et al.*, 2006) und enthalten Elemente zur Replikation (*ori*) und Selektion (β -Lactamasegen, *amp^R*) in *E. coli* (dunkelgraue Pfeile) und zur Replikation (*oriU*, *repU*) und Selektion (Gen für Tetracyclineffluxpumpe, *tet^R*) in *B. megaterium* (hellgraue Pfeile). Elemente des Xylose-induzierbaren Promotorsystems sind eingezeichnet (weißer Pfeil: Repressorgen; schwarzer dünner Pfeil: Promotor). Schwarzer dicker Pfeil: *gfp*-Gen mit Insertion des Codonclusters. Schwarze Kreise: mögliche Restriktionsstellen für die Insertion der *tRNA*-Gene.

Die Gene *tRNA*^{Ala}_{GCC} und *tRNA*^{Arg}_{CGG} liegen im *B. megaterium* DSM319 Genom einzeln vor (Tab. 14). Daher wurden die Primer für die Amplifikation so konstruiert, dass sie jeweils 200 bp upstream und downstream des Gens binden, um so zu gewährleisten, dass der putative native Promotor und putative native Terminator innerhalb des amplifizierten Fragmentes liegen. Diese beiden *tRNA*-Gene wurden je zweimal amplifiziert, wobei einmal die Schnittstellen für das Restriktionsenzym AflII und einmal die der Enzyme NaeI und EagI angehängt wurden. Über diese Schnittstellen wurden die Fragmente dann in die Vektoren des GFP-Codontestsystems so kloniert (Tab. 15, Ala und Arg), dass das Genprodukt der einklonierten *tRNA* diejenige Aminosäure überträgt, die über die Codoncluster am 5'-Terminus des *gfp* kodiert ist. Das Einfügen der *tRNA*-Gene an unterschiedliche Positionen im Vektor sollte dazu dienen, neben deren generellen Einfluss auch den Einfluss deren Lage auf die GFP Produktion zu analysieren. Dabei war die Klonierung der *tRNA*-Gene äußerst diffizil, was vermutlich an deren ausgeprägten kleeblattförmigen Sekundärstruktur bzw. an der verdrehten L-artigen Tertiärstruktur lag (Holley *et al.*, 1965; Kim *et al.*, 1974).

Tab. 15: Übersicht der Vektoren für das erweiterte GFP-Codontestsystem. Spalte 1: Aminosäure, die von den vier identischen Codons, die in *gfp* inseriert sind, kodiert wird. Spalte 2: Name der Ausgangsvektoren des GFP-Codontestsystems. Die Codoncluster aus vier identischen Codons (in Klammern vermerkt) sind 5'-terminal in das *gfp*-Gen inseriert (Gamer, 2009). Spalte 3: *tRNA*-Gen, das in den Ausgangsvektor kloniert wurde. Hochgestellt: Aminosäure, die von dieser tRNA übertragen wird. Tiefgestellt: Codon, das diese Aminosäure verschlüsselt. Spalte 4: Insertionsstellen der *tRNA*-Gene und Name der resultierenden Vektoren. Dieser Namen setzt sich aus dem Ausgangsvektor und der Aminosäure, die von dem *tRNA*-Genprodukt übertragen wird, zusammen. 1: Das *tRNA*-Gen wurde über die Schnittstelle AflIII kloniert. 2: Das *tRNA*-Gen wurde über die Schnittstellen NaeI und EagI kloniert. rv: Das *tRNA*-Gen wurde in umgekehrter Orientierung einkloniert.

Aminosäure	Ausgangsvektor	einkloniertes <i>tRNA</i> -Gen	Insertionsstelle (Abb. 15)		
			AflIII	NaeI/EagI	AatII
Ala	pGFP(GCC)	<i>tRNA</i> ^{Ala} _{GCC}	pGFP(GCC)_Ala_1	pGFP(GCC)_Ala_2	
	pGFP(GCU)		pGFP(GCU)_Ala_1	pGFP(GCU)_Ala_2	
Arg	pGFP(CGG)	<i>tRNA</i> ^{Arg} _{CGG}	pGFP(CGG)_Arg_1	pGFP(CGG)_Arg_2	
	pGFP(CGU)		pGFP(CGU)_Arg_1	pGFP(CGU)_Arg_2	
Thr	pGFP(ACC)	<i>tRNA</i> ^{Thr} _{ACC}			pGFP(ACC)_Thr pGFP(ACC)_Thr_rv
	pGFP(ACA)				pGFP(ACA)_Thr pGFP(ACA)_Thr_rv
Ser	pGFP(UCC)	<i>tRNA</i> ^{Ser} _{UCC}		pGFP(UCC)_Ser	
	pGFP(UCA)			pGFP(UCA)_Ser	
Leu	pGFP(CUC)	<i>tRNA</i> ^{Leu} _{CUC}		Nicht erstellt	
	pGFP(UUA)			Nicht erstellt	

Die Klonierung der *tRNA*-Gene, *tRNA*^{Ala}_{GCC} und *tRNA*^{Arg}_{CGG}, über die Restriktionsstellen NaeI und EagI führte zu einem schnelleren Erfolg als die Klonierung über AflIII und ermöglicht zudem ein gerichtetes Einbringen des *tRNA*-Gens im Gegensatz zu den Schnittstellen AflIII oder AatII, in die das *tRNA*-Gen in zwei Orientierungen integrieren kann. Daher sollte das *tRNA*^{Ser}_{UCC} und das *tRNA*^{Leu}_{CUC} Fragment auch über diese Schnittstellen(NaeI/EagI) eingebracht werden und zwar in entgegengesetzter Orientierung zum upstream liegenden *gfp*-Gen. Diese Orientierung wurde gewählt, um so eine verstärkte Transkription des *tRNA*-Gens, hervorgerufen durch ein Weiterlesen über den ORF des *gfps* hinaus, auszuschließen. Beide *tRNA*-Gene liegen im DSM319 Genom Operon-kodiert vor. *tRNA*^{Ser}_{UCC} ist das zweite *tRNA*-Gen in einem 17er Operon (Tab. 14, K). Daher wurde bei der Amplifikation sowohl die ca. 200 bp vom intergenomischen Bereich upstream des Operon, das erste *tRNA*-Gen des Operons als auch das dritte *tRNA*-Gen mitamplifiziert, um so zu gewährleisten, dass sich alle Sequenzen, die zur Prozessierung der tRNA nötig sind, innerhalb des amplifizierten Fragmentes befinden. Das *tRNA*^{Leu}_{CUC}-Gen ist das neunte *tRNA*-Gen innerhalb eines 11er Operons (Tab. 14, J). Hier wurde das gesamte Operon mit zusätzlich je 100 bp up- und downstream des Operons amplifiziert. Die Klonierung von *tRNA*^{Ser}_{UCC} in die entsprechenden Vektoren des GFP-Codontestsystems (Tab. 15, Ser)

mit anschließender Transformation von *E. coli* war erfolgreich, wohingegen die Klonierung und Transformation des Vektors mit dem $tRNA_{CUC}^{Leu}$ -Gen fehlschlug (Tab. 15, Leu). Dies legt nahe, dass entweder der Vektor gar nicht aufgenommen wurde oder sich die Expression der elf $tRNA$ -Gene toxisch auf den Organismus auswirkten, da es aufgrund der Promotorkonsensussequenzen möglich ist, dass die *B. megaterium* $tRNA$ -Gene auch in *E. coli* abgelesen werden. So ist zu vermuten, dass die Belastung durch „metabolic burden“ zu hoch war (Hoffmann & Rinas, 2004) oder aber die tRNAs auf andere Weise das Gleichgewicht in der Zelle störten. Zwar können *E. coli* Stämme Plasmide enthalten, die bis zu 10 $tRNA$ -Gene kodieren (Novy *et al.*, 2001), allerdings liegen diese nicht in einem Operon vor und sind zudem Organismus-eigen. Um das $tRNA_{CUC}^{Leu}$ -Gen zu klonieren, könnte man einen Teil des intergenomischen Bereiches upstream des Operons, der den putativen nativen Promotor des Operons enthält, mit dem letzten Teil des Operons, in dem sich das $tRNA_{CUC}^{Leu}$ -Gen befindet, über overlap-extension PCR amplifizieren, so dass das Fragment weniger $tRNA$ -Gene enthalten würde.

Um generell verschiedene Gene in einem Vektor zu kombinieren, ist es notwendig, dass unterschiedliche Schnittstellen genutzt werden (Abb. 15). Daher wurde das $tRNA_{ACC}^{Thr}$ -Gen über die AatII Schnittstelle in die Vektoren inseriert. Wie die $tRNA_{GCC}^{Ala}$ - und $tRNA_{CGG}^{Arg}$ -Gene liegt auch das $tRNA_{ACC}^{Thr}$ -Gen einzeln im Genom vor (Tab. 14). So wurde dieses Gen mit zusätzlich 200 bp aus dem up- und downstream intergenomischen Bereich amplifiziert und in die entsprechenden Vektoren kloniert (Tab. 15, Thr). Wie bereits erwähnt, kann das Fragment in unterschiedlicher Orientierung inserieren. Hier wurden alle möglichen Varianten erstellt (Klunkelfuß, 2013), um so die Auswirkung der $tRNA$ -Gen Orientierung auf die GFP Produktion zu analysieren.

4.1.2.2 Einfluss der Position und der Orientierung der *tRNA*-Gene im Vektor auf die rekombinante GFP Produktion

Ziel der *tRNA* Coexpression mit den *gfp*-Varianten war es, die rekombinante Produktion des Codon-ergänzten GFP aus dem Codontestsystem in möglichst hohem Maße zu steigern. Dazu sollte zunächst untersucht werden, ob es abhängig von der Position und Orientierung des jeweiligen *tRNA*-Gens im Vektor Unterschiede in der GFP Produktion gibt.

4.1.2.2.1 Einfluss der Position des entsprechenden *tRNA*-Gens im Vektor auf die rekombinante GFP Produktion

Um den Einfluss der Position des entsprechenden *tRNA*-Gens auf die GFP Produktion zu ermitteln, waren die *tRNA*-Gene $tRNA_{GCC}^{Ala}$ bzw. $tRNA_{CGG}^{Arg}$ über unterschiedliche Restriktionsstellen in die entsprechenden Vektoren kloniert worden (Tab. 15). *B. megaterium* MS941 wurde mit diesen Vektoren transformiert und die Stämme bei 37°C schüttelnd inkubiert. Sechs Stunden nach Induktion der heterologen *gfp* Expression wurden Proben entnommen und fluoreszenzspektrometrisch vermessen. Die relative Fluoreszenz dient als Maß der produzierten intrazellulären GFP Menge. Als Referenz wurden die Proben von Stämmen herangezogen, die entsprechende Vektoren des Codontestsystems ohne zusätzliche *tRNA*-Gene trugen. Parallel wurden Wachstumskurven der Produktionsstämme aufgenommen, wobei sich keine Änderung im Wachstumsverhalten bei der Coexpression von $tRNA_{GCC}^{Ala}$ bzw. $tRNA_{CGG}^{Arg}$ zeigte im Vergleich zu den Stämmen ohne *tRNA* Coexpression.

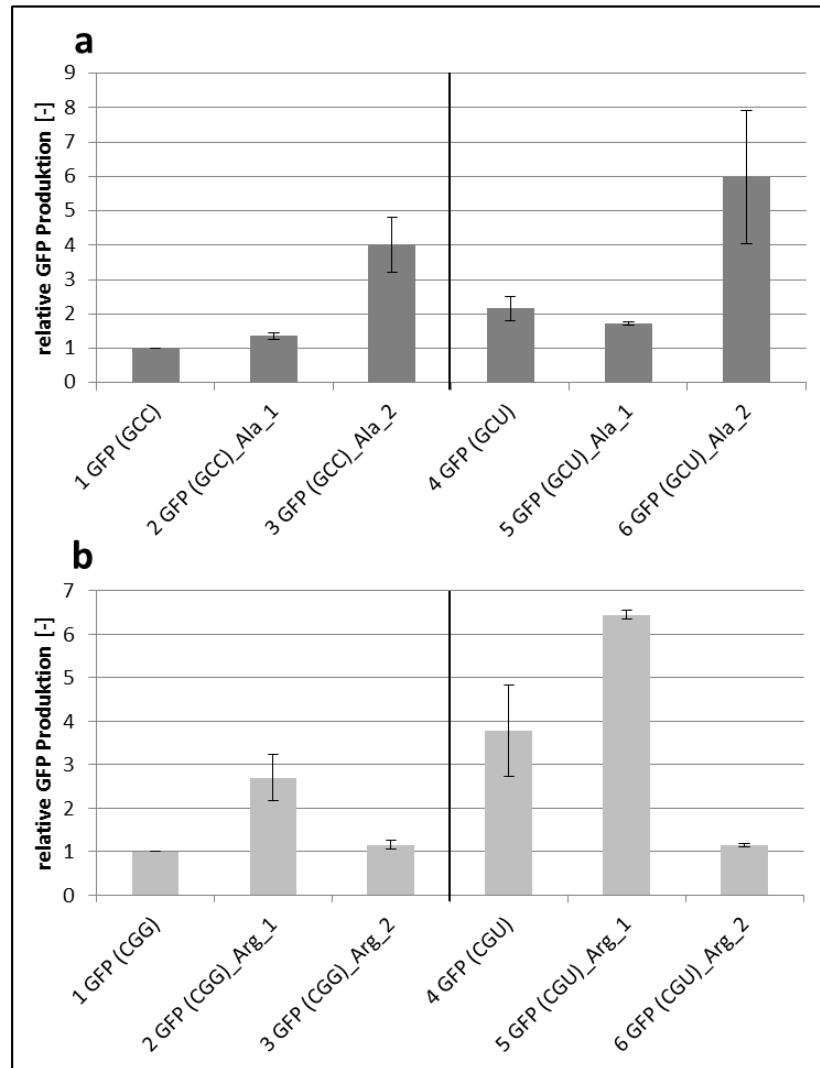


Abb. 16: Analyse der Positionseffekte der tRNA-Gene in den Vektoren des Codontestsystems. a) Positionseffekt von $tRNA^{Ala}_{GCC}$. Die Proben wurden von MS941 Stämmen entnommen, die Vektoren mit folgenden Merkmalen trugen: 1: *gfp* mit 5'-terminaler Insertion von vier aufeinanderfolgenden selten vorkommenden Codons (GCC) für Alanin. 2: wie 1 mit zusätzlicher Insertion von $tRNA^{Ala}_{GCC}$ über AflII. 3: wie 1 mit zusätzlicher Insertion von $tRNA^{Ala}_{GCC}$ über NaeI/EagI. 4: *gfp* mit 5'-terminaler Insertion von vier aufeinanderfolgenden häufig vorkommenden Codons (GCU) für Alanin. 5: wie 4 mit zusätzlicher Insertion von $tRNA^{Ala}_{GCC}$ über AflII. 6: wie 4 mit zusätzlicher Insertion von $tRNA^{Ala}_{GCC}$ über NaeI/EagI. b) Positionseffekt von $tRNA^{Arg}_{CGG}$. Die Proben wurden von MS941 Stämmen entnommen, die Vektoren mit folgenden Merkmalen trugen: 1: *gfp* mit 5'-terminaler Insertion von vier aufeinanderfolgenden selten vorkommenden Codons (CGG) für Arginin. 2: wie 1 mit zusätzlicher Insertion von $tRNA^{Arg}_{CGG}$ über AflII. 3: wie 1 mit zusätzlicher Insertion von $tRNA^{Arg}_{CGG}$ über NaeI/EagI. 4: *gfp* mit 5'-terminaler Insertion von vier aufeinanderfolgenden häufig vorkommenden Codons (CGU) für Arginin. 5: wie 4 mit zusätzlicher Insertion von $tRNA^{Arg}_{CGG}$ über AflII. 6: wie 4 mit zusätzlicher Insertion von $tRNA^{Arg}_{CGG}$ über NaeI/EagI. Alle Proben wurden mit einer Wellenlänge von 475 nm angeregt und das Emissionsmaximum (Maximum der relativen Fluoreszenz) bestimmt. Die Werte stammen aus mindestens drei unabhängigen Versuchen und wurden auf die selten vorkommenden Codon-GFP-Konstrukte, GFP (GCC) bzw. GFP (CGG), normiert.

Die Produktion von GFP konnte um das 4- bzw. 3-fache durch Coexpression von $tRNA^{Ala}_{GCC}$ erhöht werden, wenn das entsprechende tRNA-Gen über NaeI/EagI in den Vektor kloniert worden war, unabhängig davon, ob am 5'-Terminus des *gfp*-Gens selten oder häufig vorkommende Codons inseriert wurden (Abb. 16 a, 1 vs. 3 bzw. 4 vs. 6). Wenn es über AflII in den Vektor gebracht wurde, hatte es entweder nahezu keine Auswirkung (Abb. 16 a, 1 vs. 2) oder führte sogar zu einer 20 %-igen Reduktion der GFP Produktion (Abb. 16 a, 4 vs. 5). Auch bei der Coexpression von $tRNA^{Arg}_{CGG}$ konnte

ein Positionseffekt beobachtet werden. Allerdings wirkte sich hier die Coexpression von $tRNA_{CGG}^{Arg}$ positiv auf den GFP Ertrag aus, wenn das $tRNA$ -Gen über AflII in den Vektor kloniert worden war. Dabei kam es zu einer 2,7-fachen bzw. 1,7-fachen Steigerung (Abb. 16 b, 1 vs. 2 bzw. 4 vs. 5). Keine Veränderung oder eine Verringerung des GFP Ertrags um 70 % zeigte sich, wenn das $tRNA$ -Gen über NaeI/EagI eingebracht wurde (Abb. 16 b, 1 vs. 3 bzw. 4 vs. 6). Diese Ergebnisse machen deutlich, dass die Position des $tRNA$ -Gens einen Einfluss auf die rekombinante Proteinproduktion des Zielproteins hat. Da sich allerdings im Falle des $tRNA_{GCC}^{Ala}$ -Gens die Insertionsstellen NaeI und EagI und im Falle des $tRNA_{CGG}^{Arg}$ -Gens die Insertionsstelle AflII als vorteilhaft erwies, scheint es abhängig vom eingebrachten $tRNA$ -Gen zu sein, welche Position im Vektor geeignet ist. Möglicherweise ändert sich je nach DNA-Struktur des an bestimmter Position eingebrachten Fragments die Stabilität oder Integrität des Vektors, was sich auf den GFP Ertrag auswirken würde. Denkbar wäre auch, dass das $tRNA$ -Gen je nach Position unterschiedlichen Transkriptionsraten unterliegt und dadurch mehr bzw. weniger Genprodukt produziert wird. Diese Unterschiede in der tRNA-Konzentration könnten zu den beobachteten Unterschieden in der GFP Produktion führen.

4.1.2.2.2 Einfluss der Orientierung des $tRNA$ -Gens im Vektor auf die rekombinante GFP Produktion

Um zu untersuchen, wie sich die Orientierung des $tRNA_{ACC}^{Thr}$ -Gens im Vektor auf die GFP Produktion auswirkt, wurde das $tRNA_{ACC}^{Thr}$ -Gen entweder in gleicher oder entgegengesetzter Orientierung zum *gfp*-Gen in die entsprechenden Vektoren kloniert (Tab. 15). *B. megaterium* MS941 wurde mit den resultierenden Vektoren transformiert, die Stämme bei 37°C schüttelnd inkubiert und die rekombinante GFP Produktion bei einer OD_{578} von 0,4 mit 0,5 % Xylose induziert. Die Wachstumskurven der Stämme wurden aufgenommen (Abb. 17 a). Sechs Stunden nach Induktion wurden Proben entnommen und deren relative Fluoreszenz (GFP Gehalt) fluoreszenzspektrometrisch bestimmt (Abb. 17 b).

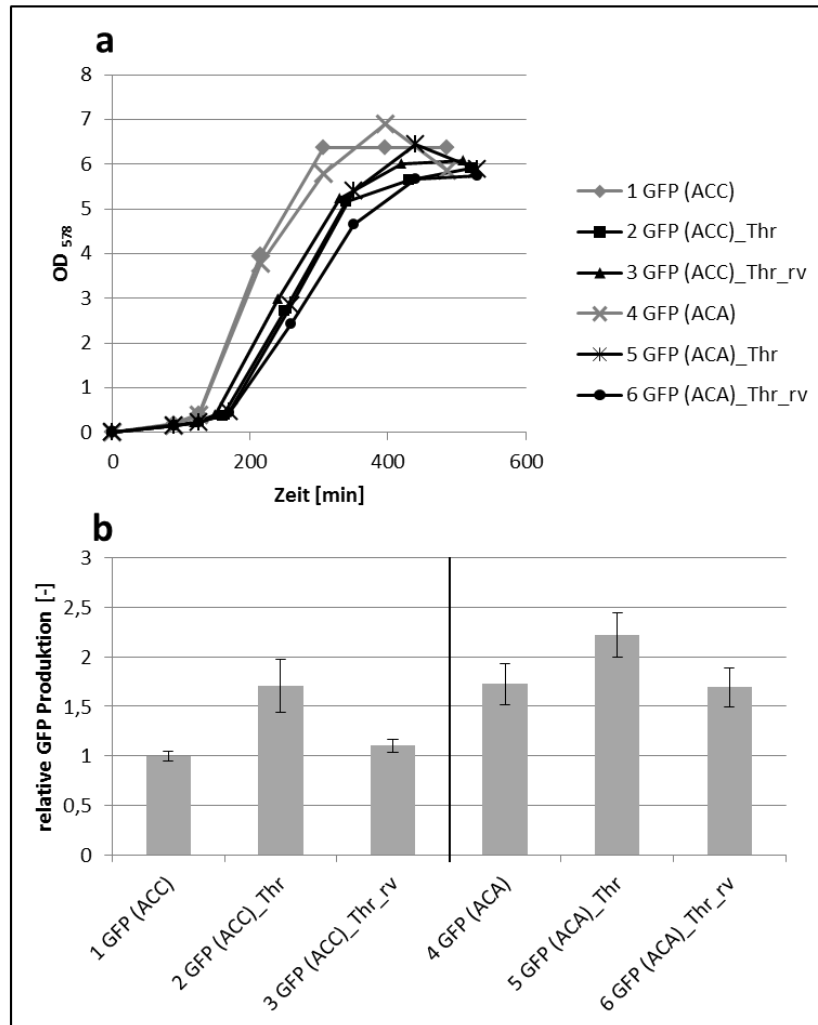


Abb. 17: Analyse des Orientierungseffekts des $tRNA^{\text{Thr}}_{\text{ACC}}$ -Gens in den entsprechenden Vektoren des Codontestsystems. Für die Analyse wurde das $tRNA^{\text{Thr}}_{\text{ACC}}$ -Gen entweder in gleicher oder in entgegengesetzter Orientierung zum *gfp*-Gen in entsprechende Vektoren eingebracht und *B. megaterium* MS941 mit diesen transformiert. Die Proben wurden von diesen MS941 Stämmen entnommen, die Vektoren mit folgenden Merkmalen trugen: 1: *gfp* mit 5'-terminaler Insertion von vier aufeinanderfolgenden selten vorkommenden Codons (ACC) für Threonin. 2: wie 1 mit zusätzlicher Insertion von $tRNA^{\text{Thr}}_{\text{ACC}}$ über AatII entgegengesetzt zu *gfp*. 3: wie 1 mit zusätzlicher Insertion von $tRNA^{\text{Thr}}_{\text{ACC}}$ über AatII in gleicher Orientierung zum *gfp*-Gen. 4: *gfp* mit 5'-terminaler Insertion von vier aufeinanderfolgenden häufig vorkommenden Codons (ACA) für Threonin. 5: wie 4 mit zusätzlicher Insertion von $tRNA^{\text{Thr}}_{\text{ACC}}$ über AflII entgegengesetzt zu *gfp*. 6: wie 4 mit zusätzlicher Insertion von $tRNA^{\text{Thr}}_{\text{ACC}}$ über AflII in gleicher Orientierung zum *gfp*-Gen. a). Auswirkung auf das Zellwachstum. Während der Kultivierung der Stämme wurde in 1,5 h Abständen die Dichte der Kulturen bei 578 nm bestimmt. Die Wachstumskurve wurde exemplarisch aus den Werten eines Versuches dargestellt. b) Auswirkung auf die GFP Produktion. Die aus drei unabhängigen Versuchen stammenden Proben wurden mit einer Wellenlänge von 475 nm angeregt und das Emissionsmaximum bestimmt. Diese wurde bei GFP (ACC) gleich 1 gesetzt und die anderen Messdaten im Verhältnis zu diesem ausgedrückt.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Orientierung des $tRNA^{\text{Thr}}_{\text{ACC}}$ -Gens die GFP Produktion unterschiedlich beeinflusst. Wenn das $tRNA^{\text{Thr}}_{\text{ACC}}$ -Gen in gleicher Richtung wie das *gfp*-Gen einkloniert war, konnte die GFP Produktion um das 1,7- bzw. 1,3-fache gesteigert werden (Abb. 17 b, 1 vs. 2 und 4 vs. 5). War das $tRNA^{\text{Thr}}_{\text{ACC}}$ -Gen jedoch entgegengesetzt des *gfp*-Gen orientiert, blieb die GFP Produktion nahezu konstant (Abb. 17 b, 1 vs. 3 und 4 vs. 6). Wahrscheinlich wird auch hier die Expression des $tRNA$ -Gens durch dessen Orientierung beeinflusst, indem der Transkriptionsprozess, insbesondere der Transkriptionsstart, abhängig von der umgebenden Sequenz in der Effizienz variiert. Diese Unterschiede in

der $tRNA_{ACC}^{Thr}$ -Konzentration könnten zu den differierenden GFP-Erträgen führen. Dass bei der Coexpression des $tRNA_{ACC}^{Thr}$ -Gens, das entgegengesetzt des *gfp*-Gens orientiert war, keine Änderung im GFP Ertrag zu detektieren war, lässt zunächst vermuten, dass keine *tRNA* Expression stattfand. Dagegen spricht allerdings, dass alle Stämme, die zusätzliche *tRNA*-Gene enthalten (unabhängig von der Orientierung), ein verlangsamtes Wachstum aufwiesen (Abb. 17 a, schwarze Kurven vs. graue Kurven). Somit scheint sich die Coexpression der $tRNA_{ACC}^{Thr}$ auf das Wachstum auszuwirken, was mit der zusätzlichen energetischen Belastung zusammenhängen könnte.

4.1.2.3 Auswirkung der Coexpression verschiedener *tRNA*-Gene auf die rekombinante GFP Produktion

In den vorangegangenen Untersuchungen war festgestellt worden, dass sich sowohl die Position der *tRNA*-Gene als auch deren Orientierung im Vektor auf die GFP Produktion im Codontestsystem auswirkte. Es waren diejenigen Konstrukte für die Coexpression des $tRNA_{GCC}^{Ala}$ -, $tRNA_{CGG}^{Arg}$ - und $tRNA_{ACC}^{Thr}$ -Gens ermittelt worden, die die besten Ergebnisse hinsichtlich der GFP Produktion lieferten. Im nächsten Schritt sollte nun genauer untersucht werden, wie sich die GFP Erträge der unterschiedlichen Konstrukte, sowohl der Codontestvektoren als auch der um ein *tRNA*-Gen erweiterten Codontestvektoren, zueinander verhalten. Diese Analyse wurde nicht nur für die oben erwähnten *tRNA*-Gene, sondern zusätzlich für die Coexpression des $tRNA_{UCC}^{Ser}$ -Gens durchgeführt.

4.1.2.3.1 Einfluss der Coexpression von $tRNA_{UCC}^{Ser}$ auf die rekombinante GFP Produktion

Um die Auswirkung der Coexpression von $tRNA_{UCC}^{Ser}$ auf die GFP Produktion zu analysieren, wurden Konstrukte in *B. megaterium* untersucht, die *gfp*-Varianten mit selten vorkommenden bzw. häufig vorkommenden Codons für Serin (UCC bzw. UCA) und das $tRNA_{UCC}^{Ser}$ -Gen enthielten (Tab. 15). Dabei wuchs der Stamm, der *gfp* mit inserierten häufig vorkommenden Codons und das $tRNA_{UCC}^{Ser}$ -Gen exprimierte, nur sehr schlecht auf LB-Tet-Agarplatten an. In Flüssigkultur zeigte sich gar kein Wachstum mehr, wohingegen die anderen Plasmidstämme, die *gfp* mit inserierten selten vorkommenden Codons und das $tRNA_{UCC}^{Ser}$ -Gen bzw. die *gfp*-Varianten ohne zusätzliche *tRNA* exprimierten, normal wuchsen (Abb. 18 a, schwarze Kurve vs. graue Kurven). Die *gfp* Expression wurde bei einer OD_{578} von 0,4 induziert. Sechs Stunden nach Induktion wurden Proben entnommen und fluoreszenzspektrometrisch vermessen (Abb. 18 b).

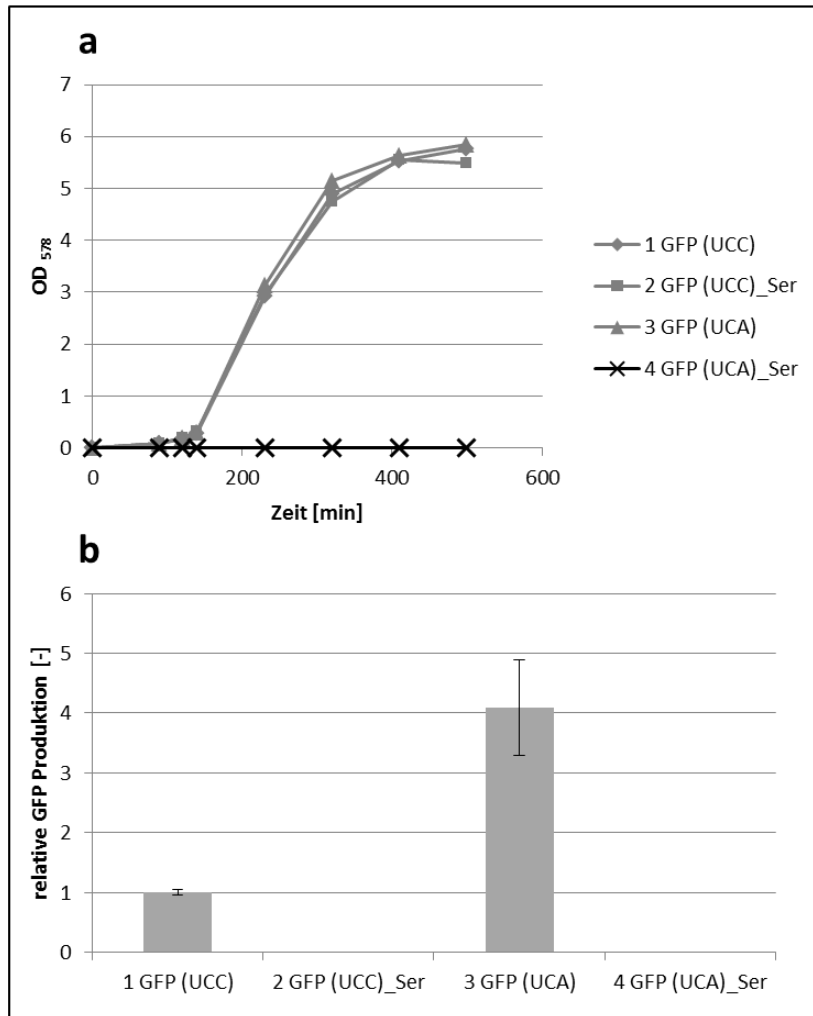


Abb. 18: Analyse zum Einfluss der $tRNA_{UCC}^{Ser}$ Coexpression auf die rekombinante GFP Produktion. Es wurden *B. megaterium* Stämme kultiviert, die Vektoren mit folgenden Merkmalen trugen: 1: *gfp* mit 5'-terminaler Insertion von vier aufeinanderfolgenden selten vorkommenden Codons (UCC) für Serin. 2: wie 1 mit zusätzlicher Insertion von $tRNA_{UCC}^{Ser}$. 3: *gfp* mit 5'-terminaler Insertion von vier aufeinanderfolgenden häufig vorkommenden Codons (UCA) für Serin. 4: wie 3 mit zusätzlicher Insertion von $tRNA_{UCC}^{Ser}$. a) Auswirkung der $tRNA_{UCC}^{Ser}$ Coexpression auf das Wachstum. Während der Kultivierung der Stämme wurde in 1,5 h Abständen die Dichte der Kulturen bei 578 nm bestimmt. Die Wachstumskurve wurde exemplarisch aus den Werten eines Versuches dargestellt. b) Auswirkung der $tRNA_{UCC}^{Ser}$ Coexpression auf die GFP Produktion. Die aus drei unabhängigen Versuchen stammenden Proben wurden 6 Stunden nach Induktion der *gfp* Expression entnommen, mit einer Wellenlänge von 475 nm angeregt und das Emissionsmaximum bestimmt. Diese wurde bei GFP (UCC) gleich 1 gesetzt und die Messdaten von GFP (UCA) im Verhältnis zu diesem ausgedrückt.

Die Messungen ergaben, dass eine 4-fache GFP Menge erzielt wurde, wenn das *gfp*-Gen ein inseriertes Cluster von vier häufig vorkommenden Codons anstelle von vier seltenen Codons (Abb. 18 b, 3 vs. 1) aufwies. Bei den Stämmen, in denen jeweils $tRNA_{UCC}^{Ser}$ coexprimiert werden sollte, fand entweder gar kein Wachstum statt (Abb. 18 a, 4) oder es konnte trotz Wachstum kein GFP detektiert werden (Abb. 18 a, 2; Abb. 18 b, 2). Die $tRNA_{UCC}^{Ser}$ scheint demzufolge eine negative Auswirkung auf die Zellvitalität bzw. auch auf die GFP Produktion zu haben. Im Falle von $tRNA_{UCC}^{Ser}$ wurden noch zwei weitere *tRNA*-Gene (*Asn-tRNA* und ein Großteil der *Glu-tRNA*) mitkloniert. Diese sollten entsprechend mitexprimiert werden, was einen hohen zusätzlichen Energieaufwand für die Zelle bedeuten kann. Bereits bei der Klonierung von $tRNA_{CUC}^{Leu}$, wo ebenfalls mehrere *tRNA*-Gene

mitkloniert werden mussten, kam es zu Wachstumsschwierigkeiten der *E. coli* Zellen (4.1.2.1). Außerdem könnten die zusätzlich produzierten tRNAs mit anderen um zelluläre Komponenten beispielsweise tRNA-Modifikationsenzymen oder Aminoacyl-tRNA-Synthetasen kompetieren, was in unbeladenen tRNAs resultieren könnte (Gustafsson *et al.*, 2004). Diese lösen eine „stringente Antwort“ aus, wodurch die Proteinproduktionsmaschinerie und auch zelluläre Abläufe heruntergefahren werden (Valdez-Cruz *et al.*, 2011). Auch könnten die zusätzlich produzierten tRNAs regulatorisch in den Organismus eingreifen. Neue Forschungserkenntnisse auf dem Gebiet der tRNAs zeigen, dass diese in gerichteter Form gespalten werden und diese Fragmente regulatorisch in der Zelle wirken (Raina & Ibba, 2014). Um genau klären zu können, warum sich zusätzlich exprimierte tRNAs negativ auf den Organismus auswirken, wären weitere Untersuchungen notwendig.

4.1.2.3.2 Einfluss der Coexpression von $tRNA_{GCC}^{Ala}$, $tRNA_{CGG}^{Arg}$ und $tRNA_{ACC}^{Thr}$ auf die rekombinante GFP Produktion

Der Einfluss der Coexpression weiterer $tRNA$ -Gene ($tRNA_{GCC}^{Ala}$, $tRNA_{CGG}^{Arg}$ und $tRNA_{ACC}^{Thr}$) wurde ebenfalls mit dem GFP-Codontestsystem analysiert. Die entsprechenden MS941 Plasmidstämme wurden kultiviert, die *gfp* Expression induziert und nach sechs Stunden Proben entnommen. Diese wurden fluoreszenzspektrometrisch vermessen und so die relative GFP Produktion bestimmt, worüber Rückschlüsse auf die Translationseffizienz gezogen wurden. Zusätzlich wurden die entsprechenden Stämme auf LB-Tet-Xyl-Agarplatten ausgestrichen, um die GFP Produktion visuell zu erfassen (Abb. 19).


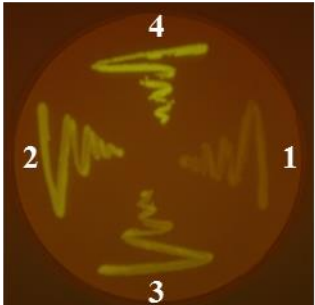

Aminosäure	<i>gfp</i> Codonclusterinsertion und einklonierte <i>tRNA</i>	Relative GFP Produktion	GFP Produktion
A Alanin	1 GCC (selten) 2 GCU (häufig) 3 GCC, $tRNA_{GCC}^{Ala}$ 4 GCU, $tRNA_{GCC}^{Ala}$	1 $2,1 \pm 0,26$ $4,2 \pm 0,85$ $6,4 \pm 1,92$	
B Arginin	1 CGG (selten) 2 CGU (häufig) 3 CGG, $tRNA_{CGG}^{Arg}$ 4 CGU, $tRNA_{CGG}^{Arg}$	1 $3,3 \pm 0,34$ $2,7 \pm 0,53$ $6,3 \pm 0,41$	
C Threonin	1 ACC (selten) 2 ACA (häufig) 3 ACC, $tRNA_{ACC}^{Thr}$ 4 ACA, $tRNA_{ACC}^{Thr}$	1 $1,7 \pm 0,03$ $1,7 \pm 0,27$ $2,5 \pm 0,14$	

Abb. 19: Analyse des Einflusses von selten bzw. häufig vorkommender Codons und Coexpression entsprechender *tRNA*-Gene auf die GFP Produktion in *B. megaterium*. Verschiedene *B. megaterium* Plasmidstämme wurden in LB-Tet-Medium, bei 37°C kultiviert. Die Induktion der *gfp* Expression erfolgte mit 0,5 % Xylose bei einer OD_{578} von 0,4. Sechs Stunden nach Induktion wurden Proben entnommen, mit einer Wellenlänge von 475 nm angeregt und das Emissionsmaximum bestimmt. Die relative GFP Produktion der Stämme, die Konstrukte mit *gfp* mit inserierten selten bzw. häufig vorkommenden Codons einer Aminosäure oder Konstrukte mit *gfp* mit inserierten selten bzw. häufig vorkommenden Codons einer Aminosäure und zusätzlicher *tRNA*, deren Genprodukt die entsprechende Aminosäure überträgt, enthielten, wurde bestimmt. Diese Werte wurden jeweils zur GFP Produktion des Plasmidstammes, der das Konstrukt mit *gfp* mit inserierten selten vorkommenden Codons enthielt, in Bezug gesetzt. Die verschiedenen *B. megaterium* Plasmidstämme wurden zudem auf Xylose-haltigen LB-Tet-Agarplatten ausgestrichen, über Nacht bei 37°C inkubiert und am nächsten Tag auf einem Blauschirm durch einen gelben Filter fotografiert.

In alle Versuchsansätze ergab sich, dass die Translationseffizienz von häufig-Codon-*gfp*-Konstrukten im Vergleich zu den selten-Codon-*gfp*-Konstrukten erhöht war. Der Anstieg in der GFP Produktion lag bei 1,7-fach für Thr (Abb. 19, C1 vs. 2), 2,1-fach für Ala (Abb. 19, A1 vs. 2) und bei 3,3-fach für Arg (Abb. 19, B1 vs. 2). Dies stimmt mit Untersuchungen, die schon früher in unserem Labor durchgeführt wurden (Gamer, 2009) und auch mit Veröffentlichungen überein, in denen berichtet wird, dass Cluster von selten vorkommenden Codons zu verminderter Translationseffizienz führen (Kane, 1995). Da dieses Phänomen auf die beschränkte Verfügbarkeit korrespondierender tRNAs zurückgeführt wird (Kane, 1995), sollten die Differenzen in der rekombinanten GFP Produktion in *B. megaterium* durch Coexpression der entsprechenden *tRNA*-Gene minimiert werden. Dies ergab, dass die zusätzliche Expression des korrespondierenden *tRNA*-Gens bei den selten-Codon-*gfp*-Konstrukten zu einer Steigerung der GFP Menge um 1,7-fach bei Thr, 2,7-fach bei Arg und 4,2-fach bei Ala (Abb. 19, C3, B3, A3) führte, was gleichzeitig die Funktionalität der jeweils produzierten tRNA bestätigte. Außerdem sollte untersucht werden, ob die *tRNA* Coexpression bei den seltenen-Codon-*gfp*-Konstrukten zu gleichen GFP Mengen führte, wie die häufig-Codon-*gfp*-Konstrukte ohne *tRNA* Coexpression. Im Falle von Arginin konnte durch die Coexpression von $tRNA_{CGG}^{Arg}$ 82 % der GFP Menge im Vergleich zum häufig-Codon-*gfp*-Konstrukt erreicht werden (Abb. 19, B3 vs. 2), während bei Threonin eine vollständige Kompensation des negativen Einflusses durch die selten vorkommenden Codons erfolgte (Abb. 19, C3 vs. 2). Bei Alanin wurde sogar eine 2-fache Steigerung der Translationseffizienz im Vergleich zum häufig-Codon-*gfp*-Konstrukt festgestellt (Abb. 19, A3 vs. 2). Dies lässt vermuten, dass nicht nur die eingeführten selten vorkommenden Codons schneller bedient werden, sondern dass die $tRNA_{GCC}^{Ala}$ zu einer generellen Produktionssteigerung führt. Einen weiteren Hinweis auf einen positiven Einfluss der *tRNA* Coexpression lieferte die Beobachtung, dass die GFP Produktion in allen Fällen, auch dann, wenn *gfp* eine Insertion von vier häufig vorkommenden Codons aufwies, durch die *tRNA* Coexpression gesteigert werden konnte. Vergleicht man die produzierte GFP Menge des häufig-Codon-*gfp*-Konstrukt und *tRNA* mit jener ohne *tRNA* so beträgt Steigerung 3-fach für Ala (Abb. 19, A2 vs. 4), 2-fach bei Arg (Abb. 19, B2 vs. 4) und 1,7-fach bei Thr (Abb. 19, C2 vs. 4). Bei Ala kann dies dadurch erklärt werden, dass $tRNA_{GCC}^{Ala}$ durch den Wobble-Mechanismus in der Lage ist, nicht nur das selten vorkommende Codon GCC für Alanin zu bedienen, sondern auch das häufig vorkommende Codon GCU (Crick, 1966) Diese könnten somit schneller translatiert werden und so zu einer höheren GFP Ausbeute führen. Die Wobble-Theorie kann jedoch nicht für die Arginin und Threonin Untersuchungen als Erklärung dienen, da weder $tRNA_{CGG}^{Arg}$ das häufig vorkommende Codon CGU für Arginin, noch $tRNA_{ACC}^{Thr}$ das häufig vorkommende Codon ACA für Threonin bedienen kann. Allerdings besitzt die mRNA des GFPs drei selten vorkommende Codons (ACC), die für Threonin kodieren, und ein selten vorkommendes Codon (CGG) für Alanin, die durch die jeweils coexprimierten *tRNAs* schneller translatiert werden könnten. Eventuell könnte durch die

Konzentrationsänderung einer seltenen tRNA in der Zelle auch wirtseigene mRNAs, die entsprechende selten vorkommende Codons oder deren Wobble-Kandidaten enthalten, effizienter translatiert werden. So stünden pro Zeiteinheit mehr Ribosomen zur Verfügung, was wiederum zu einer gesteigerten allgemeinen Translationseffizienz führen würde (Kudla *et al.*, 2009).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es in *B. megaterium* möglich ist, die negativen Effekte auf die GFP Produktion, die durch Cluster von selten vorkommenden Codons ausgelöst werden, durch die Coexpression entsprechender tRNA-Gene zu mindern ($tRNA_{\text{CGG}}^{\text{Arg}}$), auszugleichen ($tRNA_{\text{ACC}}^{\text{Thr}}$) oder sogar zu verbessern ($tRNA_{\text{GCC}}^{\text{Ala}}$). Zudem wurde festgestellt, dass die coexprimierten tRNA-Gene im Allgemeinen zu einer erhöhten Zellproduktivität beitragen.

4.1.3 Untersuchung der Produktion von rekombinanten Testproteinen bei Coexpression von tRNA-Genen

Im GFP-Codontestsystem hatte es sich gezeigt, dass die Coexpression von entsprechenden seltenen tRNA-Genen eine Steigerung der Translationseffizienz und damit der GFP Produktion zur Folge hatte. Es konnte nicht nur der negative Effekt hervorgerufen durch mehrere hintereinander liegende selten vorkommende Codons ausgeglichen, sondern auch die Translationseffizienz im Allgemeinen gesteigert werden.

Das Codontestsystem ist allerdings ein artifizielles System, bei dem die Extremsituation durch aufeinanderfolgende seltene Codons im 5'-terminalen Bereich der mRNA gegeben ist, was die Translationseffizienz stark beeinflusst (Kudla *et al.*, 2009). Daher sollte im Folgenden untersucht werden, ob und in welcher Weise die Coexpression seltener tRNA-Gene auch auf die Produktion von rekombinanten Proteinen, in deren Gensequenzen keine zusätzlichen Codoncluster eingeführt worden sind, Einfluss hat.

Da *B. megaterium* für die extra- und intrazelluläre Proteinproduktion etabliert ist, wurden sowohl ein extrazelluläres Protein, eine Hydrolase aus *T. fusca* (TFH, $M_r = 33\,000$), als auch ein intrazelluläres Protein, eine Formiatdehydrogenase aus *M. vaccae* (FDH, $M_r = 46\,000$), als rekombinante Testproteine gewählt. Beide Proteine sind von industriellem Interesse.

Die Hydrolase aus *T. fusca* besitzt außergewöhnliche hydrolytische Fähigkeiten und kann als Lipase, Esterase und Cutinase fungieren. Zudem kann die TFH aromatische Polyester wie Polyethylenterephthalat (PET) spalten. Durch diese Eigenschaften findet sie Anwendung bei der Polyesterdegradation und in der Textilfaserindustrie (Deckwer *et al.*, 2001). Die Formiatdehydrogenase aus *M. vaccae* oxidiert Formiat zu Kohlenstoffdioxid, wobei NAD^+ zu NADH reduziert wird. Dies wird beispielsweise in Multi-Enzym-Systemen genutzt, in denen FDH als Katalysator für die NADH Regeneration eingesetzt wird (Kaup *et al.*, 2003). Aufgrund ihrer enzymatischen Aktivitäten kann die Menge an produzierter TFH wie auch FDH gut über spezifische

Assays quantifiziert werden, was eine wichtige Voraussetzung für die Untersuchungen in dieser Arbeit war. Für eine effiziente Expression heterologer Gene ist eine gute Anpassung deren Codons an den Codongebrauch des Wirtes entscheidend. Mit einem Codon Adaptation Index (CAI) der nativen Gene der hier zu untersuchenden Proteine von 0,15 (TFH) bzw. 0,14 (FDH) sind diese jedoch schlecht an die Codonusage von *B. megaterium* angepasst, was ebenfalls wichtig war, um sie als Modelle für die Untersuchungen zur *tRNA* Coexpression zu nutzen. In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass eine rekombinante Proteinproduktion in *B. megaterium* nur möglich war, wenn die Gene von TFH und FDH an dessen Codonusage angepasst wurden. Dabei wurden ein CAI von 0,86 (TFH) bzw. 0,97 (FDH) erreicht (Yang *et al.*, 2007; Bäumchen *et al.*, 2007). Somit standen in dieser Arbeit sowohl die nativen (*tfh.nat*, *fdh.nat*) als auch die codonoptimierten Gensequenzen (*tfh.opti*, *fdh.opti*) zur Verfügung, wobei *tfh.nat* und *tfh.opti* jeweils mit der Gensequenz des *B. megaterium* eigenen Signalpeptids (SP_{LipA}) fusioniert war, um die Sekretion des Zielproteins zu gewährleisten. Die nativen Sequenzen enthalten 39 % (*tfh.nat*) bzw. 38 % (*fdh.nat*) an Codons, die mit einer Häufigkeit < 1 % im *B. megaterium* Genom vorkommen, wobei diejenigen Codons (GCC, CGG, ACC), die von den coproduzierten tRNAs bedient werden, mit einer Häufigkeit von 1 bis 5 % vertreten sind (Tab. 16). In den optimierten Sequenzen finden sich hingegen nur noch 11 % (*tfh.nat*) bzw. 9 % (*fdh.nat*) an seltenen Codons und bis auf drei GCC Codons in der Sequenz von *tfh.opti* keine Codons, die von den hier coproduzierten tRNAs bedient werden (Tab. 16).

Tab. 16: Merkmale der Proteine, *T. fusca* Hydrolase und *M. vaccae* Formiatdehydrogenase, für die Untersuchungen zur Coexpression seltener *tRNA*-Gene. Die Sekretion von TFH wird durch die Fusion mit einem *B. megaterium* eigenen Signalpeptid (SP_{LipA}) vermittelt. Als selten vorkommende Codons sind diejenigen definiert, die mit einer Häufigkeit < 1 % im *B. megaterium* Genom vorkommen. Der Anteil der selten vorkommenden Codons ist der Quotient aus Anzahl der selten vorkommenden Codons und der Gesamtanzahl der Aminosäuren (= Gesamtanzahl der Codons) im jeweiligen Protein.

Testprotein	Ursprung	Größe	Sekre- tiert	Gen- sequenz	Anzahl selten vorkommender Codons			
					gesamt	Ala (GCC)	Arg (CGG)	Thr (ACC)
Hydrolase mit SP _{LipA} (TFH.nat)	Thermo- bifida fusca	308 Amino- säuren	+	nativ	121 39 %	17 5 %	6 2 %	15 5 %
Hydrolase mit SP _{LipA} und His ₆ (TFH.opti)		318 Amino- säuren		optimiert	34 11 %	3 1 %	0	0
Formiatde- hydrogenase (FDH.nat)	Mycobac- terium vaccae	415 Amino- säuren	-	nativ	158 38 %	20 5 %	3 1 %	18 4 %
Formiatde- hydrogenase (FDH.opti)				optimiert	35 9 %	0	0	0

4.1.3.1 Klonierung der Vektoren für die Coexpression von *tfh* und *fdh* mit unterschiedlichen *tRNAs*

Es waren mit pYYBm1, pYYBm9 (Yang *et al.*, 2007) und pARBm3 (Bäumchen *et al.*, 2007) bereits Vektoren vorhanden, die die Gene *tfh.nat*, *tfh.opti* und *fdh.opti* unter der Kontrolle des nativen Xylose-induzierbaren Promotors enthielten. Daher musste nur *fdh.nat* mit entsprechenden Primern aus pCBBm1 (Bäumchen *et al.*, 2007) amplifiziert und unter die Kontrolle des nativen Xylose-induzierbaren Promotors in den Expressionsvektor pMM1522 (Malten *et al.*, 2006) eingebracht werden. Diese Vektoren dienten als Kontrolle ohne zusätzliches *tRNA*-Gen (Abb. 20, A). Um die erneute Klonierung der *tRNA*-Fragmente zu vermeiden, wurden die bereits existierenden Vektoren des GFP-Codontestsystems, die schon entsprechende *tRNA*-Gene enthielten, verwendet und *gfp* durch die nativen und codonoptimierten Gene der Testproteine ausgetauscht (Abb. 20, B-D). Weiterhin wurden Kombinationen erstellt, die das jeweilige Testgen mit $tRNA_{GCC}^{Ala}$ und $tRNA_{CGG}^{Arg}$ enthielten (Abb. 20, E). In diese Vektoren wiederum wurde $tRNA_{ACC}^{Thr}$ gebracht, um auch die Coexpression von drei *tRNA*-Genen zu untersuchen (Abb. 20, F, Klunkelfuß, 2013). Mit dem $tRNA_{ACC}^{Thr}$ -Fragment waren zusätzlich noch die Restriktionsstellen BamHI und NotI in den Vektor eingeführt worden, um eine Erweiterung des tRNA-Systems zu ermöglichen. Ein weiteres einzubringendes *tRNA*-Gen könnte am 5'-Terminus die Schnittstelle für BglII und am 3'-Terminus die Schnittstellen BamHI gefolgt von NotI aufweisen. So kann dieses Fragment über BglII und NotI geschnitten werden. Da BglII den gleichen Basenüberhang wie BamHI generiert, kann das Fragment in den BamHI/NotI geschnittenen Vektor eingebunden werden. Dabei verschwindet zwar die BglII/BamHI Schnittstelle, gleichzeitig wird aber eine neue BamHI Schnittstelle eingebracht. So besteht die Möglichkeit wieder ein Fragment über BamHI und NotI in den Vektor zu bringen.

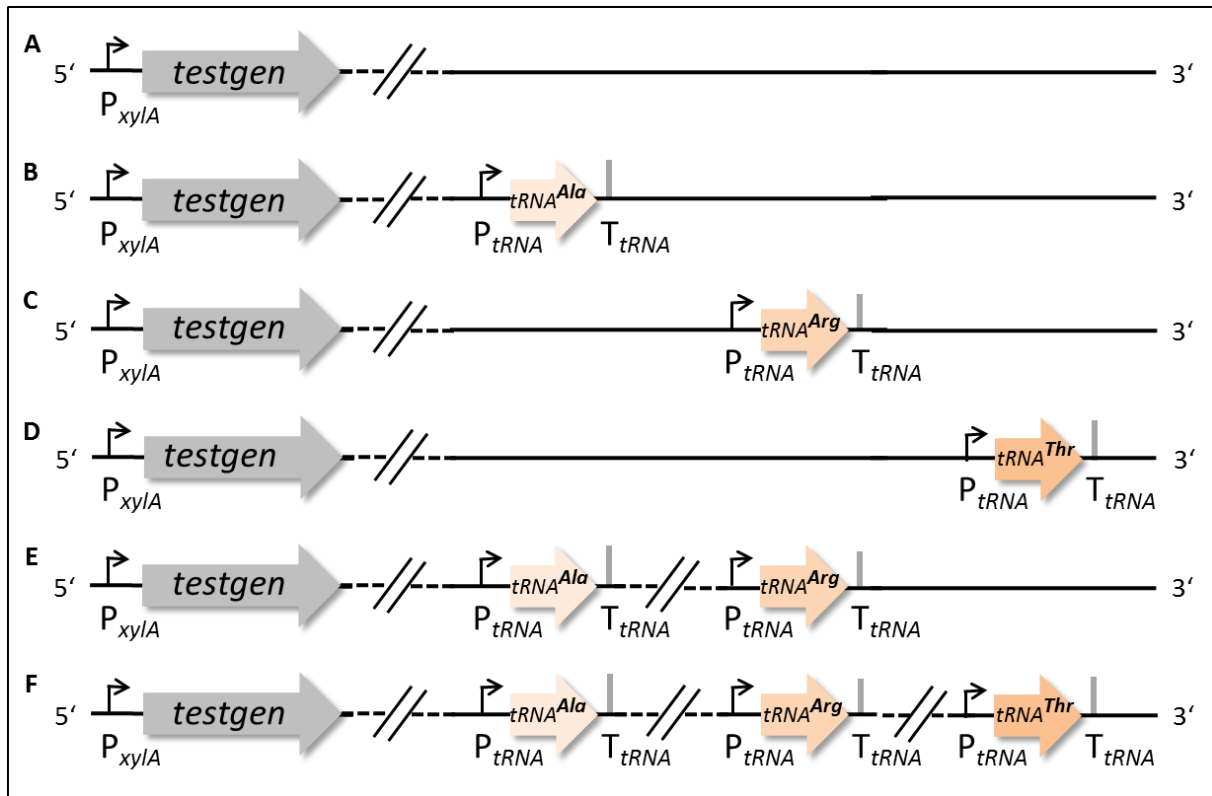


Abb. 20: Schematische Darstellung der Vektoren zur Untersuchung der rekombinanten Produktion der Modellproteine TFH und FDH bei Coexpression von tRNA-Genen. A) Als Testgen (grauer Pfeil) wurde sowohl das Hydrolasegen aus *T. fusca*, das mit *sp*_{LipA} (Sequenz eines Signalpeptids für die Sekretion) fusioniert war, entweder in nativer (*tfh.nat*) oder codon-optimierter Form (*tfh.opti*) als auch das Formiatdehydrogenasegen aus *M. vaccae* entweder in nativer (*fdh.nat*) oder codon-optimierter Form (*fdh.opti*) verwendet. Diese Gene wurden jeweils unter die Kontrolle des nativen Xylose-induzierbaren Promotors (*P_{xylA}*) kloniert. B-D) Diese Vektoren enthalten zusätzlich zum Testgen einzelne tRNA-Gene flankiert von ihrem putativen Promotor (*P_{tRNA}*) und putativem Terminator (*T_{tRNA}*). E) Die Kombination aus B und C ergab die Vektoren mit den unterschiedlichen Testgenen, dem *tRNA^{Ala}_{GCC}*- und dem *tRNA^{Arg}_{CGG}*-Gen. F) In die Vektoren E wurde zusätzlich das *tRNA^{Thr}_{ACC}*-Gen mit putativem Promotor (*P_{tRNA}*) und Terminator (*T_{tRNA}*) kloniert. Dies ergab Vektoren mit den unterschiedlichen Testgenen und drei tRNA-Genen. Diese 24 Vektorkonstrukte wurden einzeln in *B. megaterium* MS941 eingebracht, um die rekombinante Produktion der Modellproteine zu untersuchen.

4.1.3.2 Auswirkung der *tRNA* Coexpression auf die Menge an rekombinanter TFH bzw. FDH

B. megaterium MS941 wurde mit allen TFH- und FDH-Testvektoren einzeln transformiert und die neuen Plasmidstämme in LB-Tet-Flüssigmedium kultiviert. Die heterologe *tfh* bzw. *fdh* Expression wurde bei einer OD₅₇₈ von 0,4 mit Xylose induziert. Sechs Stunden nach Induktion wurden Proben für die Analyse der rekombinanten Proteinproduktion entnommen. Für die Quantifizierung der TFH im Überstand wurden die Zellen geerntet und mit dem Überstand ein Hydrolaseaktivitätstest durchgeführt. Über die ermittelten Enzymaktivitäten konnte die relative TFH Produktion bestimmt werden (Yang *et al.*, 2007). Die Menge an intrazellulärer FDH wurde bestimmt, indem die Zellen geerntet, aufgeschlossen und der zellfreie Extrakt im FDH Assay eingesetzt wurde. Auch hier lässt die Enzymaktivität Rückschlüsse auf die produzierte FDH Menge zu (Roth, 2005).

Rekombinante TFH Produktion in *B. megaterium*

Die Produktion von TFH.nat konnte durch die Coexpression von $tRNA_{CGG}^{Arg}$ um 18 % gesteigert werden (Abb. 21 a). Allerdings ging dies mit einem verlangsamten Wachstum des Produktionsstammes einher, der nur 60 % der finalen optischen Dichte des Referenzstammes (FDH.nat) erreichte (Anhang, Abb. 37 A). Dies deutet darauf hin, dass die vermehrte rekombinante Proteinproduktion das Zellwachstum negativ beeinflusste. Die Coexpression von $tRNA_{ACC}^{Thr}$ hingegen ergab fast keine Änderung (5 % weniger), während sich die Coexpression von $tRNA_{GCC}^{Ala}$ (45 % weniger) bzw. $tRNA_{GCC}^{Ala}$ und $tRNA_{CGG}^{Arg}$ (14 % weniger) und $tRNA_{GCC}^{Ala}$, $tRNA_{CGG}^{Arg}$ und $tRNA_{ACC}^{Thr}$ (49 % weniger) sogar negativ auf die Menge an rekombinanter TFH auswirkten (Abb. 21 a). Wird die Auswirkung der Coexpression von seltenen *tRNA*-Genen mit der Anzahl der korrespondierenden Codons in der Sequenz (Ala (20), Arg (3), Thr (18), Tab. 16) verglichen, zeigt sich, dass die Codonanzahl nicht als Maß dienen kann, ob die Coexpression der entsprechenden *tRNA* eine Steigerung der rekombinanten Proteinmenge bewirkt. Diese Aussagen wird auch dadurch bestätigt, dass die Produktion von TFH.opti, deren Gensequenz keine korrespondierenden seltenen Codons enthält, durch die Coexpression von $tRNA_{ACC}^{Thr}$ um das 1,5-fache und durch die Coexpression von $tRNA_{CGG}^{Arg}$ sogar um das 2,3-fache gesteigert werden konnte (Abb. 21 b). Die zusätzliche Expression von $tRNA_{GCC}^{Ala}$ bzw. $tRNA_{GCC}^{Ala}$ und $tRNA_{CGG}^{Arg}$ hatten hingegen kaum eine Auswirkung auf die TFH.opti Menge (Abb. 21 b). Der rekombinante Stamm, der $tRNA_{GCC}^{Ala}$, $tRNA_{CGG}^{Arg}$ und $tRNA_{ACC}^{Thr}$ zusammen mit *tfh.opti* exprimieren sollte, zeigte reproduzierbar in Flüssigmedium kein Wachstum mehr (Anhang, Abb. 37 B). Die Plasmidstämme, die drei *tRNAs* allein bzw. mit *tfh.nat* coexprimierten, konnten jedoch wachsen (Anhang, Abb. 37 B bzw. A). So liegt der Schluss nahe, dass genau die Kombination der Coexpression von *tfh.opti* und der drei *tRNAs* hier zu Wachstumsdefizienz führte.

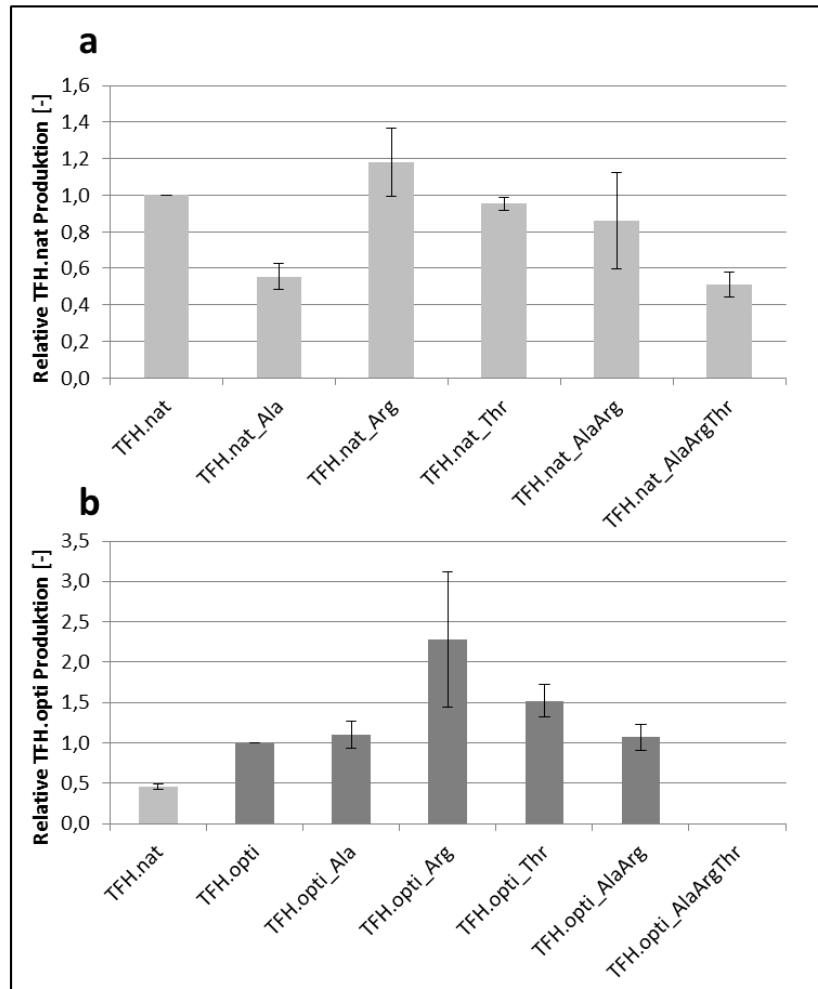


Abb. 21: Einfluss von coexprimierten *tRNAs* auf die rekombinante TFH Produktion. *tfh.nat* und *tfh.opti* wurden jeweils ohne, mit einem *tRNA*- (*tRNA*^{Ala}_{GCC} oder *tRNA*^{Arg}_{CGG} oder *tRNA*^{Thr}_{ACC}), mit zwei *tRNA*- (*tRNA*^{Ala}_{GCC} und *tRNA*^{Arg}_{CGG}) oder mit drei *tRNA*-Genen (*tRNA*^{Ala}_{GCC}, *tRNA*^{Arg}_{CGG} und *tRNA*^{Thr}_{ACC}) coexprimiert. Dafür wurden die entsprechenden *B. megaterium* Plasmidstämme in LB-Tet-Medium bei 37°C kultiviert. Bei einer OD₅₇₈ von 0,4 wurde die heterologe *tfh* Expression mit 0,5 % Xylose induziert. Nach 6 Stunden wurden die Zellen abzentrifugiert, der zellfreie Überstand abgenommen und im TFH Aktivitätsassay eingesetzt. Bei der Spaltung von *p*-Nitrophenylpalmitat durch TFH wird das gelbliche *p*-Nitrophenol frei, was spektrometrisch erfasst werden kann. So kann die Enzymaktivität bestimmt werden, welche indirekt die produzierte TFH Menge in der Probe widerspiegelt. a) Einfluss der *tRNA* Coexpression auf die TFH.nat Produktion. Die Werte stammen aus drei unabhängigen durchgeführten Experimenten. Sie wurden gemittelt und auf den Wert von FDH.nat bezogen, der gleich 1 gesetzt wurde. b) Einfluss der *tRNA* Coexpression auf die TFH.opti Produktion. Die Daten stammen aus drei unabhängigen Versuchen. Der Mittelwert von den TFH.opti Proben wurde gleich 1 gesetzt und die anderen Werte dazu in Beziehung gesetzt. Um den Unterschied zwischen TFH.nat und TFH.opti zu zeigen, wurde außerdem TFH.nat bezogen auf TFH.opti dargestellt.

Rekombinante FDH Produktion in *B. megaterium*

In den Proben von FDH.nat wie auch FDH.nat mit coexprimierter $tRNA_{ACC}^{Thr}$ konnte keine FDH-Enzymaktivität gemessen werden (Abb. 22 a), wobei im SDS-Gel auf entsprechender Höhe eine Proteinbande zu sehen ist (Abb. 22 a*, Bahn 1 und 4). Diese Bande erscheinen allerdings auch bei der Kultivierung mit „leerem“ Vektor und ist daher auf ein stammeigenes Protein zurückzuführen, das dieselbe molekulare Masse wie FDH.nat besitzt (Abb. 22 a*, Bahn L). Bei Coexpression von *fdh.nat* und $tRNA_{GCC}^{Ala}$ bzw. $tRNA_{CGG}^{Arg}$ konnte die FDH.nat Produktion auf ein detektierbares Maß gesteigert werden (Abb. 22 a, a*, Bahn 2 und 3). Eine bis zu 18-fache Steigerung der FDH.nat Menge im Vergleich zum Ertrag von FDH.nat mit einer zusätzlichen tRNA war möglich, indem zwei ($tRNA_{GCC}^{Ala}$ und $tRNA_{CGG}^{Arg}$) oder drei tRNAs ($tRNA_{GCC}^{Ala}$, $tRNA_{CGG}^{Arg}$ und $tRNA_{ACC}^{Thr}$) coexprimiert wurden (Abb. 22 a, a*, Bahn 5 und 6).

Die Codonadaptation der gesamten Gensequenz von FDH hatte einen stark positiven Einfluss auf die FDH Produktion (vgl. Abb. 22 a, a*, Bahn 1 und Abb. 22 b, b*, Bahn 7), was auch schon früher berichtet wurde (Bäumchen *et al.*, 2007). Die Coexpression der $tRNA_{ACC}^{Thr}$ resultierte in einer verminderten FDH.opti Menge, während die Coexpression von $tRNA_{GCC}^{Ala}$ keinen Einfluss zeigte (Abb. 22 b, b* Bahn 10 bzw. 8). Eine Steigerung von 1,9 bis 2,1-fach konnte durch die Coexpression von $tRNA_{CGG}^{Arg}$, zwei ($tRNA_{GCC}^{Ala}$ und $tRNA_{CGG}^{Arg}$) oder drei tRNAs ($tRNA_{GCC}^{Ala}$, $tRNA_{CGG}^{Arg}$ und $tRNA_{ACC}^{Thr}$) erreicht werden (Abb. 22 b, b* Bahn 9, 11 und 12).

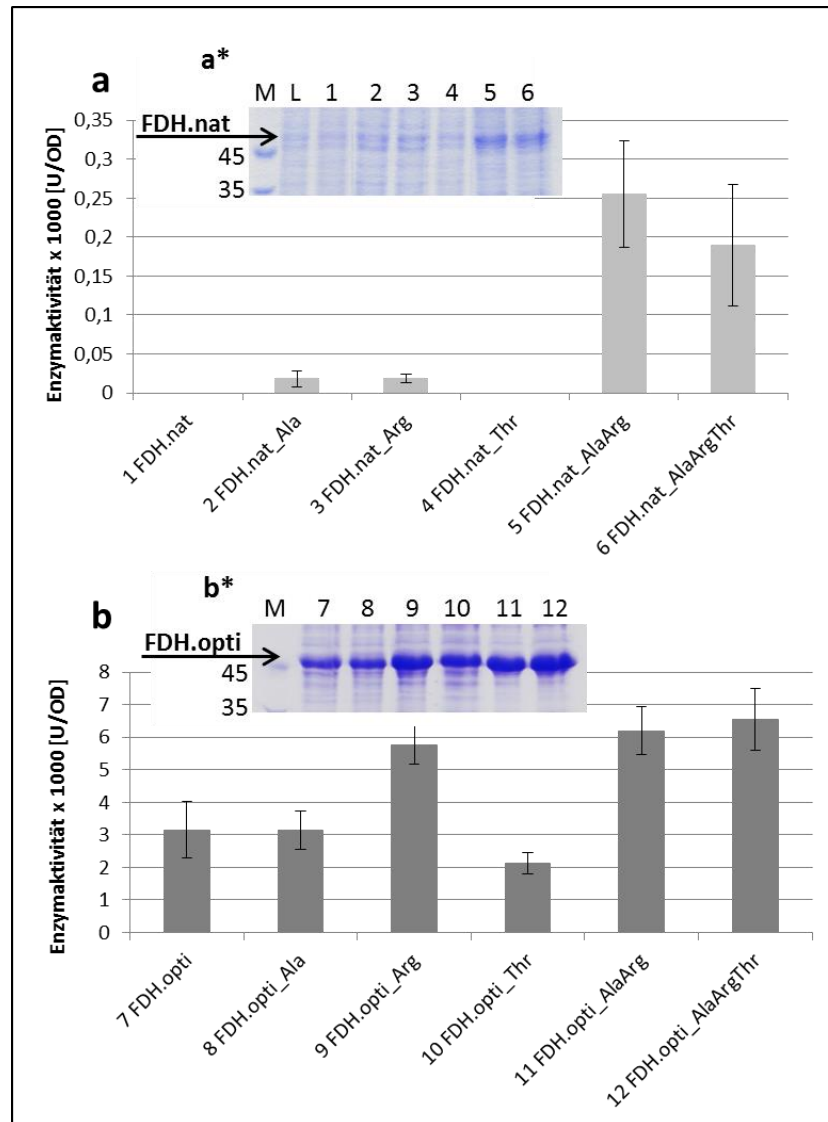


Abb. 22: Einfluss von coexprimierten tRNAs auf die rekombinante FDH Produktion. *fdh.nat* und *fdh.opti* wurden jeweils ohne, mit einem *tRNA*- (*tRNA*^{Ala}_{GCC} oder *tRNA*^{Arg}_{CGG} oder *tRNA*^{Thr}_{ACC}), mit zwei *tRNA*- (*tRNA*^{Ala}_{GCC} und *tRNA*^{Arg}_{CGG}) oder mit drei *tRNA*-Genen (*tRNA*^{Ala}_{GCC}, *tRNA*^{Arg}_{CGG} und *tRNA*^{Thr}_{ACC}) coexprimiert. Dafür wurden die entsprechenden *B. megaterium* Plasmidstämme in LB-Tet-Medium bei 37°C kultiviert. Bei einer OD₅₇₈ von 0,4 wurde die *fdh* Expression mit 0,5 % Xylose induziert. Nach 6 Stunden wurden die Zellen geerntet und mit einem FastPrep®-24 Homogenisator aufgeschlossen. Der Zellextrakt wurde zentrifugiert und der zellfreie Überstand, der FDH enthielt, im FDH Aktivitätsassay eingesetzt. FDH setzt Formiat zu Kohlenstoffdioxid um, wobei NADH freigesetzt wird. Über die spektrometrische Detektion von NADH kann die Enzymaktivität bestimmt werden, welche indirekt ein Maß für die produzierte FDH Menge in der Probe ist. a) Einfluss der *tRNA* Coexpression auf die FDH.nat Produktion. Enzymaktivitäten aus drei unabhängigen Versuchen wurden herangezogen, gemittelt und für eine übersichtlichere Darstellung mit 1000 multipliziert. a*) Vergleich der FDH.nat Produktion mit und ohne coexprimierter *tRNAs*. Sechs Stunden nach Induktion wurden 3 x 10⁷ Zellen entnommen, mit Lysozym aufgeschlossen und Zelltrümmer sowie unlösliches Protein durch Zentrifugation abgetrennt. Die Proteine der löslichen Fraktion wurde über SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie Blue angefärbt. M: Molecular weight marker (x 1000 Da, Fermentas), 1: FDH.nat, 2: FDH.nat_Ala, 3: FDH.nat_Arg, 4: FDH.nat_Thr, 5: FDH.nat_AlaArg, 6: FDH.nat_AlaArgThr. b) Einfluss der *tRNA* Coexpression auf die FDH.opti Produktion. Enzymaktivitäten aus drei unabhängigen Versuchen wurden herangezogen, gemittelt und für eine übersichtlichere Darstellung mit 1000 multipliziert. b*) Vergleich der FDH.opti Produktion mit und ohne coexprimierter *tRNAs*. Sechs Stunden nach Induktion wurden 3 x 10⁷ Zellen entnommen, mit Lysozym aufgeschlossen und Zelltrümmer sowie unlösliches Protein durch Zentrifugation abgetrennt. Die Proteine der löslichen Fraktion wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie Blue angefärbt. M: Molecular weight marker (x 1000 Da, Fermentas), 1: FDH.opti, 2: FDH.opti_Ala, 3: FDH.opti_Arg, 4: FDH.opti_Thr, 5: FDH.opti_AlaArg, 6: FDH.opti_AlaArgThr.

Über das Wachstumsverhalten der Stämme, die für die tRNA Coproduktionsversuche von TFH und FDH eingesetzt worden sind, lässt sich zusammenfassend sagen, dass die Coproduktion von $tRNA_{GCC}^{Ala}$ mit den rekombinanten Proteinen (TFH.nat/opti, FDH.nat/opti) kaum eine Auswirkung hatte (Anhang, Abb. 37 A, B, C, D). Die Coexpression von $tRNA_{CGG}^{Arg}$ bzw. $tRNA_{ACC}^{Thr}$ oder tRNA Kombinationen hatte ein langsames Wachstum und geringere finale Zell-Dichten (um 10-20 % reduziert) im Vergleich mit den Produktionsstämmen, die keine zusätzlichen tRNAs exprimierten, zur Folge (Anhang, Abb. 37 A, B, C, D). Abweichend verhielt sich der Stamm, der *tfh.nat* mit $tRNA_{CGG}^{Arg}$ coexprimierte. Er zeigte ein signifikant schlechteres Wachstum und erreichte nur 60 % der finalen Dichte des Kontrollstammes (Anhang, Abb. 37 A). Wie oben bereits erwähnt, zeigte außerdem der Stamm, der den Vektor TFH.opti_AlalArgThr trug, gar kein Wachstum in Flüssigmedium (Anhang, Abb. 37 B). Die beobachteten Wachstumsdefizite sind wahrscheinlich auf die zusätzliche metabolische Belastung für die Zelle, hervorgerufen durch die Coproduktion von rekombinantem Protein und zusätzlichen tRNAs, zurückzuführen. Des Weiteren könnte es durch die Überexpression von tRNAs zu einem Engpass bei der Aminosäureactelylierung und der tRNA Modifikation kommen, was sich wiederum negativ auf das Wachstum aber auch auf die Translationseffizienz auswirkt (Wahab *et al.*, 1993).

Der Nutzen von coexprimierten tRNA-Genen in *B. megaterium* scheint stark von den Eigenschaften des jeweiligen Proteins, das produziert werden soll, abhängig zu sein. Die hier beobachteten Unterschiede könnten darauf zurückgeführt werden, dass die TFH als extrazelluläres Protein mehr energetische Kosten verursacht als die Produktion der intrazellulären FDH, da nicht nur Energie für die Produktion, sondern auch für die Sekretion aufgewendet werden muss. Daher kann möglicherweise die Coexpression von *fdh* und mehreren tRNA-Genen besser toleriert werden (Abb. 22 a, 6 FDH.nat_AlalArgThr; b, 12 FDH.opti_AlalArgThr), während die Coexpression von *tfh* und mehreren tRNA-Genen eine zu große Belastung für die Zelle darstellt (Abb. 21 a, TFH.nat_AlalArg, TFH.nat_AlalArgThr; b, TFH.opti_AlalArg, TFH.opti_AlalArgThr).

Die nativen Gensequenzen von TFH und FDH beinhalten beide 5 % der seltenen Codons (GCC) für die Aminosäure Alanin (Tab. 16). Allerdings liegen nur bei *fdh.nat* an zwei Stellen GCC-Tandems (zwei identische aufeinanderfolgende GCCs) vor. Gerade Tandems aus selten vorkommenden Codons haben eine negative Auswirkung auf die Translationseffizienz (Kane, 1995), die jedoch durch die Expression von entsprechenden tRNAs aufgehoben werden kann (Del Tito *et al.*, 1995; Burgess-Brown *et al.*, 2008). So könnte erklärt werden, dass die Coexpression von $tRNA_{GCC}^{Ala}$ zu einer Produktionssteigerung von FDH.nat führt, von TFH.nat jedoch nicht (Abb. 22 a, 2 FDH.nat_Alal; Abb. 21 a, TFH.nat_Alal). Ohne Coexpression von zusätzliche tRNAs lässt sich die FDH.nat Menge nicht detektieren, wohingegen TFH.nat produziert wird (Abb. 22 a, 1 FDH.nat; Abb. 21 a, TFH.nat), obwohl beide native Gensequenzen einen nahezu identischen CAI haben und daher ähnlich gut exprimiert

werden sollten. Dieser Unterschied könnte auch damit zusammenhängen, dass *tfh.nat* am 5'-Terminus mit einer *B. megaterium* eigenen Signalpeptidsequenz fusioniert ist, welche einen CAI von 0,4 besitzt. Da gerade Codons am 5'-Ende einen großen Einfluss auf die Translationseffizienz besitzen (Kudla *et al.*, 2009), könnte sich dies vorteilhaft auf die Translation auswirken.

Durch Coexpression von $tRNA_{GCC}^{Ala}$ und $tRNA_{CGG}^{Arg}$ mit *fdh.nat* wurde die höchste FDH.nat Menge erzielt, die ca. 9 % der FDH.opti Menge entspricht (Abb. 22 a, 5 FDH.nat_AlaArg vs Abb. 22 b, 7 FDH.opti). TFH.nat konnte durch die Coexpression von $tRNA_{CGG}^{Arg}$ sogar so weit gesteigert werden, dass sie 60 % der TFH.opti Menge erreichte (Abb. 21 a, TFH.nat_Arg vs Abb. 21 b, TFH.opti).

Diese Ergebnisse zeigen also eindeutig, dass es durch Coexpression seltener *tRNA*-Gene möglich ist, die Produktion rekombinanter Proteine in *B. megaterium* überhaupt zu gewährleisten bzw. zu steigern, deren Gensequenz nicht an die Codonusage von *B. megaterium* adaptiert ist.

Aber auch die rekombinante Produktion der Proteine TFH und FDH, deren Gensequenz codonoptimiert worden war, ließ sich durch Coexpression von $tRNA_{CGG}^{Arg}$ (Abb. 22 b, 9 FDH.opti_Arg, Abb. 21 b, TFH.opti_Arg), durch $tRNA_{ACC}^{Thr}$ (Abb. 22 b, 10 FDH.opti_Thr) oder durch mehrere *tRNAs* (Abb. 21 b, TFH.opti_AlaArg, TFH.opti_AlaArg) bis zur 2-fachen Menge steigern. Dies bestätigt, wie auch schon im GFP-Codontestsystem gezeigt, dass sich die *tRNA* Coexpression generell positiv auf die rekombinante Proteinproduktion auswirken kann, auch wenn die Gensequenz des rekombinanten Proteins keines oder nur wenige entsprechende selten vorkommende Codons enthält (Tab. 16). Wie bereits diskutiert, könnte ein möglicher Grund für diesen Effekt die globale Steigerung der Translationseffizienz in der Zelle durch die bessere Verfügbarkeit von seltenen *tRNAs* sein.

Besonders interessant ist, dass die Coexpression von $tRNA_{CGG}^{Arg}$ in allen vier Ansätzen (native/codonoptimierte Gensequenz, intra-/extrazellulär) eine Steigerung der Proteinproduktion bewirkte. Somit scheint $tRNA_{CGG}^{Arg}$ eine Sonderrolle in *B. megaterium* einzunehmen. In *E. coli* wird $tRNA^{Arg}$ mit der Vermittlung von Plasmidstabilität und Plasmidreplikation in Verbindung gebracht (Brinkmann *et al.*, 1989). Eventuell hat $tRNA_{CGG}^{Arg}$ in *B. megaterium* eine vergleichbare Funktion. So ließe sich der gesteigerte rekombinante Proteintrag auf eine höhere Kopienzahl und größere Stabilität des Expressionsvektors zurückführen. Des Weiteren ist bekannt, dass $tRNA^{Arg}$ sowohl an der Zellwandformierung als auch am Proteinabbau beteiligt sind (Banerjee *et al.*, 2010), was einen indirekten Effekt auf die Zellvitalität und damit auf die Proteinproduktion haben könnte.

4.1.3.3 Vergleich des intrazellulären Proteoms zwischen rekombinant FDH produzierendem *B. megaterium* ohne und mit coexprimierten seltenen *tRNA*-Genen

Bei den Untersuchungen zur Coexpression von seltenen *tRNA*-Genen während der rekombinanten Proteinproduktion in *B. megaterium* wurde herausgefunden, dass sich der Ertrag an rekombinantem Protein auch dann steigern ließ, wenn dessen kodierende Gensequenz keine Codons enthielt, die von den coproduzierten tRNAs bedient wurden. Damit ergab sich die Frage, auf welche Weise die coexprimierten seltenen *tRNA*-Gene zur Produktionssteigerung beitragen. Um dies zu untersuchen, sollte das intrazelluläre Proteom eines *B. megaterium* Plasmidstammes, der ein rekombinantes Protein produziert, untersucht werden und mit dem eines Plasmidstammes verglichen werden, der das gleiche rekombinante Protein und zusätzlich seltene tRNAs coproduzierte. Da sich der Ertrag der Formiatdehydrogenase (codonoptimierte Sequenz) aus *M. vaccae* (FDH.opti) durch die Coexpression von *tRNA*^{Ala}_{GCC} und *tRNA*^{Arg}_{CGG} in *B. megaterium* signifikant steigern ließ (um das 2,1-fache), wurden die Produktionsstämme mit und ohne diese *tRNA*-Gene (MS941 pFDH.opti und MS941 pFDH.opti_AlalArg) für den Proteomvergleich genutzt. Beide Stämme wurden kultiviert und die *fdh.opti* Expression bei einer OD₅₇₈ von 0,4 mit Xylose induziert. Die Zellen wurden in der mid-log-Phase (ca. OD₅₇₈ 3) geerntet. Nach dem Zellaufschluss folgte die Präparation der Proteine und die massenspektrometrische Analyse.

Aus den Peptiddaten der beiden *B. megaterium* Plasmidstämme konnten insgesamt 586 Proteinen identifiziert werden. Davon wurden 50 als „conserved hypothetical proteins“ klassifiziert.

Da eine vergleichende Proteomanalyse durchgeführt wurde, kann über die absoluten Proteinkonzentrationen in der Zelle keine Aussagen getroffen werden. Zum relativen Vergleich wurden die Proteine in fünf Gruppen eingeteilt. Gruppe 1: Proteine, die nur in MS941 pFDH.opti detektiert wurden (Anhang, Tab. 20), Gruppe 2: Proteine, die nur in MS941 pFDH.opti_AlalArg detektiert wurden (Anhang, Tab. 21), Gruppe 3: Proteine, die im Stamm MS941 pFDH.opti hochreguliert (d.h. ≥ 2 -fach vorhanden) waren (Anhang, Tab. 22), Gruppe 4: Proteine, die im Stamm MS941 pFDH.opti_AlalArg hochreguliert waren (Anhang, Tab. 23) und Gruppe 5: Proteine, die in beiden Stämmen in gleichem Maße vorliegen (Daten nicht gezeigt). Dabei fielen in die 5. Gruppe über die Hälfte der identifizierten Proteine (381). Die Gruppen 1-4 umfassten je 61, 14, 47 bzw. 83 Proteine, welche anschließend hinsichtlich ihres Gehalts an selten vorkommenden Codons, die für Alanin (GCC) bzw. Arginin (CGG) kodieren, analysiert wurden. Unter Einbeziehung aller ORFs des *B. megaterium* Genom konnte festgestellt werden, dass durchschnittlich 3 GCC Codons bzw. 1 CGG Codon pro ORF vorhanden sind. Lag der Gehalt an seltenen Codons der Gensequenz des untersuchten Proteins über den jeweiligen Werten, wurde sie daher als „mit überdurchschnittlichem Gehalt“ eingestuft (Tab. 17).

Tab. 17: Analyse des Gehalts von den in *B. megaterium* selten vorkommenden Codons Ala (GCC) und Arg (CGG). Es wurde die Gesamtanzahl der selten vorkommenden Ala (GCC) und Arg (CGG) im *B. megaterium* Genom bestimmt und anschließend durch die Anzahl der gesamten ORFs geteilt. Das Ergebnis stellte den durchschnittlichen Anteil der GCC bzw. CGG Codons pro ORF dar. Lag die Anzahl von GCC bzw. CGG in der Gensequenz der untersuchten Proteine über diesem Wert, wurde diese als „mit überdurchschnittlichem Anteil an GCC bzw. CGG“ gewertet. Gruppe 1: Proteine, die nur in MS941 pFDH.opti detektiert wurden, Gruppe 2: Proteine, die nur in MS941 pFDH.opti_AlaArg detektiert wurden, Gruppe 3: Proteine, die im Stamm MS941 pFDH.opti hochreguliert waren, Gruppe 4: Proteine, die im Stamm MS941 pFDH.opti_AlaArg hochreguliert waren und Gruppe 5: Proteine, die in beiden Stämmen in gleichem Maße vorliegen.

Gruppe	Anzahl untersuchter Proteine	Anzahl bzw. prozentualer Anteil der Proteine mit überdurchschnittlichem Gehalt an seltenen Codons	
		Ala (GCC)	Arg (CGG)
1	61	15 \triangleq 25 %	11 \triangleq 18 %
2	14	7 \triangleq 50 %	4 \triangleq 29 %
3	47	15 \triangleq 31 %	8 \triangleq 17 %
4	83	39 \triangleq 47 %	18 \triangleq 22 %
5	381	130 \triangleq 34 %	73 \triangleq 19 %

In Gruppe 2 und 4 besitzt ca. die Hälfte der untersuchten Gensequenzen einen überdurchschnittlichen Anteil an seltenen GCC Codons, während dies in Gruppe 1, 3 und 5 nur auf 25-34 % zutrifft (Tab. 17). Eine ähnliche Tendenz ist auch bezüglich des Vorkommens von seltenen CGG Codons festzustellen. 29 bzw. 22 % der Proteine aus Gruppe 2 und 4 haben eine Gensequenz mit überdurchschnittlichem Anteil an seltenen CGG Codons. Dagegen liegt dieser Anteil in Gruppe 1, 3 und 5 nur zwischen 17 und 19 % (Tab. 17). Somit finden sich in den Gensequenzen der Proteine, die nur im tRNA supplementierten *B. megaterium* Stamm vorkommen (Gr. 2) oder in diesem hochreguliert sind (Gr. 4), vermehrt seltene GCC und CGG Codons. Dies lässt den Schluss zu, dass durch die Coexpression von $tRNA_{GCC}^{Ala}$ und $tRNA_{CGG}^{Arg}$ die wirtseigenen mRNAs, die diese seltenen Codons aufweisen, effizienter translatiert werden konnten und dadurch die entsprechenden Proteine in größeren Mengen in der Zelle vorliegen. Damit wird deutlich, dass durch die Coexpression von $tRNA_{GCC}^{Ala}$ und $tRNA_{CGG}^{Arg}$ die zelluläre Translationseffizienz zunimmt. Das bedeutet, dass die seltenen Codons CGG und GCC sowie dessen Wobble-Kandidat schneller bedient werden können und dass somit in gleicher Zeiteinheit wieder mehr Ribosomen verfügbar sind, deren Kapazität für die rekombinate FDH.opti Produktion ausreicht. Im *B. megaterium* Stamm hingegen, in dem keine tRNAs coexprimiert werden, können die Ribosomen an selten vorkommenden Codons pausieren (Kane, 1995). Damit würden weniger freie Ribosomen zur Verfügung stehen, worauf die Zelle mit einer Hochregulation der Produktion an Ribosomenkomponenten reagiert, um den durch die rekombinante Proteinproduktion vermehrten Translationsbedarf zu decken. Dies wird dadurch unterstützt, dass sich unter den Proteinen, die nur im Stamm ohne tRNA Coexpression detektiert

wurden (Gr.1) oder in diesem vermehrt vorliegen (Gr.3) viele ribosomale Proteine (Anhang, Tab. 20 und Tab. 22) befinden.

Ein weiterer Hinweis für eine effizientere Translation im Stamm, der zusätzliche *tRNAs* exprimiert, könnte sein, dass in diesem verschiedene Enzyme vermehrt vorkommen (Gr.4), die Basenmodifikationen an *tRNA* oder *rRNA* vermitteln. Dazu zählen die Queuin-*tRNA*-Ribosyltransferase, die 3-fach hochreguliert ist, die RNA-Pseudouridinsynthase die 2-fach hochreguliert ist und die 7-fach hochregulierte 23S *rRNA* Uracil-5-Methyltransferase (RumA) (Anhang, Tab. 23). Die Queuin-*tRNA*-Ribosyltransferase tauscht im Anticodon der *tRNA* Guanosin gegen Queuosin aus, während die RNA-Pseudouridinsynthase in verschiedenen RNA-Typen Uridin zu Pseudouridin isomerisiert. Beide Modifikationen können sich auf Translationsebene auswirken (Meier *et al.*, 1985; Charette & Gray, 2000). RumA modifiziert die 23S *rRNA* und wurde in *E. coli* damit in Verbindung gebracht, die Ribosomenperformance zu erhöhen (Persaud *et al.*, 2010). Demnach könnten diese Kandidaten zur verbesserten Translationseffizienz beitragen.

Die Proteomdaten zeigen außerdem, dass sich unter den hochregulierten Proteinen im *tRNA* coexprimierenden Stamm (Gr.4) einige befinden, die in der Pyrimidin oder Purin Biosynthese eine Rolle spielen (Anhang, Tab. 23). Diese Hochregulation der Nucleotidbiosynthesepoteine deutet auf einen gesteigerten Nucleotidbedarf hin. Da die $tRNA^{Arg}$ in *E. coli* mit der Plasmidreplikation in Verbindung gebracht wird (Brinkmann *et al.*, 1989), könnte die Coexpression von $tRNA_{CGG}^{Arg}$ auch in *B. megaterium* eine vermehrte Replikation des Expressionsvektors hervorrufen, welche diesen erhöhten Nukleotidbedarf verursacht. Aufgrund der erhöhten Kopienzahl des Vektors könnten mehr *fdh.opti*-Gene gleichzeitig abgelesen werden, was in der beobachteten gesteigerten FDH.opti Produktion resultiert.

Aus den Proteomdaten ergeben sich somit vorläufige Hinweise, dass durch die Coexpression von $tRNA_{GCC}^{Ala}$ und $tRNA_{CGG}^{Arg}$ eine verbesserte Translationseffizienz und möglicherweise eine erhöhte Plasmidkopienzahl gegeben ist, was zu einer Steigerung der FDH.opti Produktion führt.

4.2 Studien zur Interaktion zwischen HemC und HemD aus *Bacillus megaterium*

Bereits in den 70er Jahren wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Proteine Porphobilinogendessaminase, HemC, und Uroporphyrinogen-III-Synthase, HemD, zwei aufeinanderfolgende Enzyme im Tetrapyrrolbiosyntheseweg, miteinander interagieren (Higuchi & Bogorad, 1975). Zu dieser Vermutung führte die Tatsache, dass das Produkt von HemC, Preuroporphyrinogen, sehr labil ist und bei der Freisetzung spontan zu Uroporphyrin I oxidiert, das nicht mehr von dem darauffolgenden Enzym HemD als Substrat verwendet werden kann. Stattdessen sammelt sich Uroporphyrin I an, welches für die Zelle toxisch ist (Jahn *et al.*, 1996). Um die spontane Oxidation des Preuroporphyrinogens zu umgehen und eine Enzym-katalysierte Umsetzung sicherzustellen wird vermutet, dass durch eine Interaktion zwischen HemC und HemD dieses Intermediat direkt übergeben wird („Substrat-Channelling“). Dies wird dadurch bekräftigt, dass die Gene *hemC* und *hemD* in vielen Bakterien in einem Operon vorliegen (Layer *et al.*, 2010), was deren simultane und äquimolare Expression gewährleistet. In *Leptospira interrogans* wurde zudem eine HemC-HemD Fusion gefunden und auch *Plasmodium falciparum* besitzt ein Enzym, welches sowohl die HemC- als auch die HemD-Aktivität aufweist (Guegan *et al.*, 2003; Nagaraj *et al.*, 2008). Dies zeigt, dass eine Freisetzung des Intermediats ausgeschlossen werden soll und bestärkt damit die Annahme einer Interaktion zwischen HemC und HemD auch in Organismen, in denen keine Fusion dieser Proteine existiert.

In dieser Arbeit sollte mit Hilfe von *in vivo* und *in vitro* Methoden die Interaktion zwischen HemC und HemD nachgewiesen werden. Hierfür wurden die entsprechenden Enzyme aus *B. megaterium* verwendet, da dieser Organismus sowohl in unserer Arbeitsgruppe als auch in der Gruppe von Prof. Warren an der University of Kent schon seit Jahren hinsichtlich der Vitamin B₁₂-Produktion erforscht wird und viele Enzyme des Vitamin B₁₂-Biosynthesewegs inzwischen stabil und in großen Mengen sowohl homolog als auch rekombinant hergestellt werden können (Raux *et al.*, 1998; Martens *et al.*, 2002; Biedendieck *et al.*, 2010b; Moore *et al.*, 2014).

4.2.1 In vivo Interaktionsstudien

Untersuchungen *in vivo* durchzuführen bietet den großen Vorteil, dass physiologische Bedingungen herrschen und Komponenten, die am nachzuweisenden Vorgang beteiligt sind, zur Verfügung stehen. So wird die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass sich beispielsweise Protein-Protein Interaktionen in ihrer natürlichen Umgebung, der Zelle, ausbilden und nachgewiesen werden können.

4.2.1.1 Bacterial Two-Hybrid (BACTH) Assay in *E. coli*

Das Bacterial Two-Hybrid System wurde 1998 von Karimova und Mitarbeitern als Alternative zur weit verbreiteten Yeast Two-Hybrid Methode (Fields & Song, 1989) etabliert, um den *in vivo* Nachweis von Protein-Protein Wechselwirkungen auch in Prokaryonten zu ermöglichen (Karimova *et al.*, 1998). Es basiert auf einer Calmodulin (CaM)-abhängigen Adenylatcyclase, die durch das Gen *cyoA* kodiert wird (Hewlett *et al.*, 1976; Glaser *et al.*, 1988). Die Besonderheit dieser Adenylatcyclase aus *Bordetella pertussis* ist, dass sie sich in zwei Untereinheiten, die Calmodulinbindedomäne (T18) und die katalytische Domäne (T25), teilen lässt (Ladant *et al.*, 1989). Diese lagern sich nur bei Anwesenheit des eukaryotischen Proteins Calmodulin zusammen und bilden so eine funktionale Adenylatcyclase, die Adenosintriphosphat (ATP) in cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) umwandelt. Werden beide Untereinheiten T18 und T25 einzeln in einem *E. coli* Stamm coproduziert, dessen endogene Adenylatcyclase inaktiviert wurde (*cyoA*⁻), ist nahezu keine Adenylatcyclaseaktivität nachzuweisen (Battesti & Bouveret, 2012) (Abb. 23 A). Werden T18 und T25 dagegen mit Proteinen, die interagieren, genetisch fusioniert, übernehmen diese die Funktion des Calmodulins, indem die Untereinheiten in räumliche Nähe kommen, wodurch die Adenylatcyclase funktionell komplementiert und cAMP synthetisiert wird. Im Komplex mit dem Katabolit-Aktivatorprotein (CAP) wirkt cAMP als pleiotropischer Transkriptionsregulator, der unter anderem die Expression der Gene für den Transport und Verwertung von Maltose und Lactose aktiviert (Abb. 23 B). Nur wenn eine Interaktion zwischen den mit T18 und T25 fusionierten Proteinen stattfindet, ist der *cyoA*⁻ *E. coli* Reporterstamm in der Lage, entsprechende Gene zu exprimieren und diese alternativen Kohlenstoffquellen zu nutzen. Dies kann qualitativ über entsprechende Indikatorplatten wie MacConkey-Agarplatten mit Maltose bzw. Lactose Zusatz und LB X-Gal-Agarplatten oder über einen quantitativen β -Galactosidaseassay nachgewiesen werden.

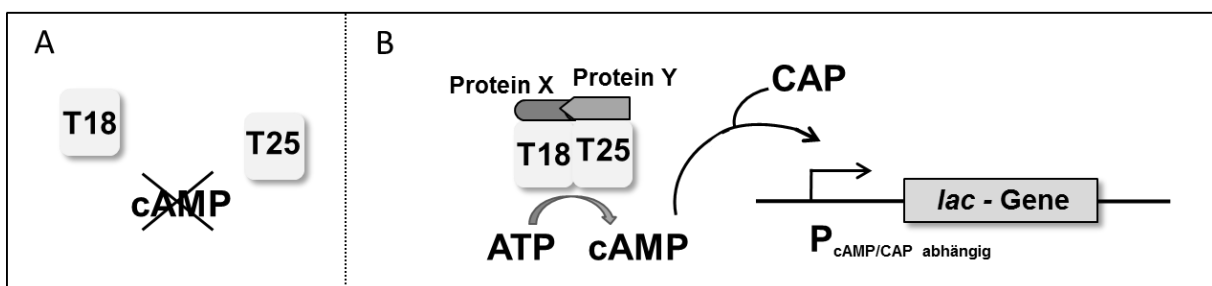


Abb. 23: Schematische Darstellung des BACTH-Prinzips. A) Die Subdomänen der Adenylatcyclase können sich nicht spontan zusammenschließen. Somit findet keine cAMP Synthese statt. B) Sind die Subdomänen mit Interaktionspartnern fusioniert, bilden sie einen Komplex, was zur funktionellen Komplementation der Adenylatcyclase führt und zur Synthese von cAMP. Der Komplex aus cAMP und CAP aktiviert die Transkription verschiedener kataboler Operons wie etwa des Lactose-Operons (Karimova *et al.*, 2000).

4.2.1.1.1 Konstruktion der BACTH-Vektoren

Um die Interaktion zwischen HemC und HemD aus *B. megaterium* DSM509 im BACTH System zu untersuchen, müssen die Proteine entsprechend mit dem T18 bzw. T25 Fragment der Adenylatcyklase fusioniert und diese Hybridproteine in der *cya⁻* Zelle coproduziert werden. Hierfür existieren die kompatiblen *E. coli* Vektoren pUT18 bzw. pUT18C und pKNT25 bzw. pKT25 (Euromedex). Erstere kodieren die Subdomäne T18, letztere das Fragment T25. Die Expression aller Gene steht unter der Kontrolle des nativen Lac-Promotors. Die Gene von *hemC* und *hemD* wurden amplifiziert und dann „in frame“ individuell am 3'- oder 5'-Terminus mit *t18* bzw. *t25* fusioniert (Suwandhi, 2012). So entstanden acht verschiedene Vektoren (Abb. 24), die in unterschiedlichen Kombinationen für die Versuche eingesetzt werden konnten. Als positive Kontrolle dienten die pUT18C-*zip* und pKT25-*zip* Plasmide, welche die Gensequenz für das Leucin-Zipper Motiv eines Transkriptionsaktivators aus der Hefe kodiert. Es ist bekannt, dass dieses Leucin Zipper Motiv mit hoher Affinität dimerisiert (Karimova *et al.*, 2000). Die Vektoren pUT18C und pKT25 wurden als negative Kontrolle genutzt.

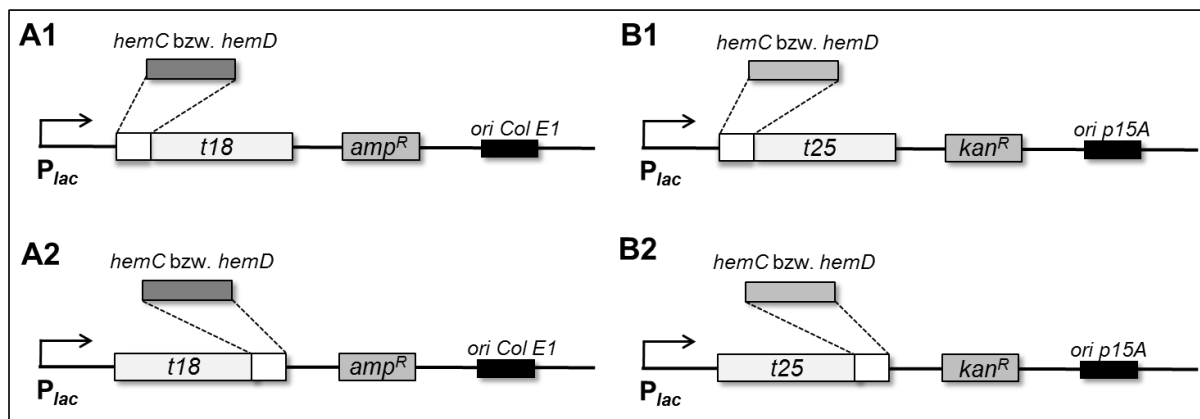


Abb. 24: Vektoren für die Untersuchung der HemC-HemD Wechselwirkung mittels BACTH. A) High copy Vektoren basierend auf pUC19 mit Ampicillinresistenzgen. 1: pUT18*hemC* bzw. pUT18*hemD*, die Gensequenz des T18 Fragments der Adenylatcyclase aus *B. pertussis* wurde am 5'-Terminus mit *hemC* bzw. *hemD* fusioniert. 2: pUT18*ChemC* bzw. pUT18*ChemD*, wie A1, jedoch erfolgte die Fusion am 3'-Terminus. B) Low copy Vektoren basierend auf pSU40 mit Kanamycinresistenzgen. 1: pKNT25*hemC* bzw. pKNT25*hemD*, die Gensequenz des T25 Fragments der Adenylatcyclase aus *B. pertussis* wurde am 5'-Terminus mit *hemC* bzw. *hemD* fusioniert. 2: pKT25*hemC* bzw. pKT25*hemD*, wie B1, jedoch erfolgte die Fusion am 3'-Terminus.

4.2.1.1.2 Analyse der HemC-HemD-Wechselwirkung via BACTH

Der Adenylatcyclase-defiziente *E. coli* Reporterstamm BTH101 wurde mit verschiedenen kompatiblen Vektorkombinationen cotransformiert und anschließend auf MacConkey-Agarplatten ausgestrichen. Die Platten wurden zwei Tage bei 30°C inkubiert und dann ausgewertet (Suwandhi, 2012).



Abb. 25: Analyse der HemC-HemD Interaktion via BACTH Assay (Suwandhi, (2012)). BTH101 Reporterstämme, mit unterschiedlichen Plasmidkombinationen wurden auf MacConkey-Agarplatten ausgestrichen und zwei Tage bei 30°C inkubiert. 1: Negative Kontrolle BTH101 (pUT18C + pKT25). 2: Positive Kontrolle BTH101 (pUT18C-*zip* + pKT25-*zip*). 3: BTH (pKT25*hemC* + pUT18*hemD*). 4: BTH101 (pKT25*hemC* + pUT18*ChemD*). 5: BTH101 (pKNT25*hemC* + pUT18*hemD*). 6: BTH101 (pKNT25*hemC* + pUT18*ChemD*). 7: BTH101 (pKT25*hemD* + pUT18*hemC*). 8: BTH101 (pKT25*hemD* + pUT18*ChemC*). 9: BTH101 (pKNT25*hemD* + pUT18*hemC*). 10: (pKNT25*hemD* + pUT18*ChemC*).

Bei der bakteriellen Verwertung von Lactose bzw. Maltose wird eine Säure freigesetzt, die einen Farbumschlag des im MacConkey Medium enthaltenen pH-Indikators bewirkt. Ist ein *E. coli* BTH101-Plasmidstamm in der Lage, Lactose bzw. Maltose zu verwerten, färben sich die Zellen rot. Findet dagegen keine Verwertung statt, bleiben die Zellen weiß. Es ist eine deutliche Rotfärbung der positiven Kontrolle (BTH101 pUT18C-*zip* + pKT25-*zip*, Abb. 25-2) und des BTH101 Plasmidstammes (pKNT25*hemC* + pUT18*hemD*, Abb. 25-3) zu sehen, während die anderen BTH101 Plasmidstämme, darunter auch die Negativkontrolle, weiß erscheinen. Dieses Ergebnis war reproduzierbar und sprach zunächst für eine Interaktion zwischen HemC und HemD, wenn HemC N-terminal mit T25 und HemD N-terminal mit T18 fusioniert war. Bei nachfolgenden Untersuchungen auf MacConkey-Agarplatten färbten sich sogar vier weitere BTH101 Plasmidstämme rot, allerdings teilweise auch die entsprechenden Negativkontrollstämme, die mit einem Hybridfusionsvektor und einem Leervektor transformiert worden waren (Daten nicht gezeigt, Suwandhi, 2012). Es ist nicht möglich, eine Erklärungen für diese falsch-positive Detektion der Negativkontrollen zu geben, zumal diese nicht durchgängig auftraten. Jedoch wird spekuliert, dass weitere Signale neben cAMP die Expression von Kataboloperons beeinflussen können (Reznikoff, 1992), dass es *E. coli* eigene Calmodulin-ähnliche Proteine gibt (Michiels *et al.*, 2002), die T18 und T25 ohne Beteiligung von interagierenden Fusionsproteinen zusammenführen und dass eine falsche Faltung der Fusionsproteine ihre Affinität zu anderen Proteinen erhöht (Battesti & Bouveret, 2012), was zu falsch positiven Resultaten führen könnte.

Bei der Analyse verschiedener BTH101 Plasmidstämme mittels LB X-Gal Platten und β -Galactosidaseassay deuteten die Ergebnisse zusätzlich auf eine Interaktion zwischen HemC und HemD hin, wobei sich keine Präferenz ableiten ließ, ob eine N- oder C-terminale Fusion mit den komplementären Fragmenten der Adenylcyclase von Vorteil war (Daten nicht gezeigt, Suwandhi, 2012). Die uneinheitlichen Aussagen über die Interaktion zwischen HemC und HemD auf MacConkey, X-Gal-Platten und β -Galactosidaseassay könnte möglicherweise auf eine transiente bzw. dynamische Interaktion zurückzuführen sein. Zusätzlich zeigten auf LB X-Gal Platten und bei dem β -Galactosidaseassay Negativkontrollstämme zum Teil positive Signale. Daher können die Ergebnisse der BACTH Untersuchung zwar als Hinweis auf eine Interaktion zwischen den Proteinen HemC und HemD gesehen werden, jedoch nicht als Nachweis, da sich die BACTH Methode im Rahmen dieser Untersuchungen nicht immer als zuverlässig erwies.

4.2.1.2 Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) in *B. megaterium*

Der Fluoreszenz-(Förster)-Resonanzenergietransfer (FRET) wurde erstmals 1948 von Theodor Förster beschrieben (Förster, 1948) und kann unter anderem dazu genutzt werden, Protein-Protein-Interaktionen *in vivo* nachzuweisen. Die physikalische Grundlage liegt im strahlenlosen Energietransfer (Dipol-Dipol Wechselwirkung) von einem angeregten Fluorophor (Donor) auf ein anderes Fluorophor (Akzeptor), welches die Energie in Form von Fluoreszenz abgibt. Um diese zu detektieren, sollte der Abstand der Fluorophore zueinander 10 nm nicht überschreiten, da die Effizienz der Energieübertragung mit steigendem Abstand abnimmt. Eine weitere Voraussetzung für den Energietransfer ist die Überlappung des Emissionsspektrums des Donors mit dem Anregungsspektrum des Akzeptors (Abb. 26 A1, grüner Graph, blau gestrichelter Graph) sowie eine parallele Orientierung der Dipolmomente des Donors und des Akzeptors (Abb. 26 A2). Durch die Entwicklung diverser Fluoreszenzproteine stehen inzwischen eine Vielzahl von potentiellen Fluorophor-Paaren zu Verfügung, die diese spektrale Eigenschaft erfüllen, wobei vor allem CFP (Cyan Fluorescence Protein) und YFP (Yellow Fluorescence Protein) häufig Anwendung finden (Shaner *et al.*, 2005; Piston & Kremers, 2007). Für die FRET-Analyse werden CFP und YFP mit den putativen Interaktionspartnern fusioniert. Nur wenn eine Wechselwirkung zwischen den Interaktionspartnern auftritt und dadurch CFP (Donor) und YFP (Akzeptor) in räumliche Nähe kommen, ist bei entsprechender Anregung des Donors eine Emission des Akzeptors (FRET-Signal) detektierbar (Abb. 26 B). Es ist zu beachten, dass die Intensität der Akzeptorfluoreszenz nicht nur durch das FRET-Signal an sich, sondern zusätzlich durch die Anregung des Akzeptors mit der Anregungswellenlänge des Donors (direkte Anregung) und das Übersprechen der Donorfluoreszenz in die Emissionswellenlänge des Akzeptors (Übersprechen) zustande kommt (Abb. 26 A, rote Pfeile 1 und 2). Diese Einflüsse müssen durch entsprechende Kontrollen korrigiert werden.

Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist, dass nicht nur aufgrund des Energietransfers ein Nachweis der Protein-Protein-Interaktion erfolgen kann, sondern dass es auch möglich ist, die fluoreszenzgetaggten Proteine in der Zelle zu lokalisieren, was aufgrund der enormen Zellgröße von *B. megaterium* vielversprechend erschien.

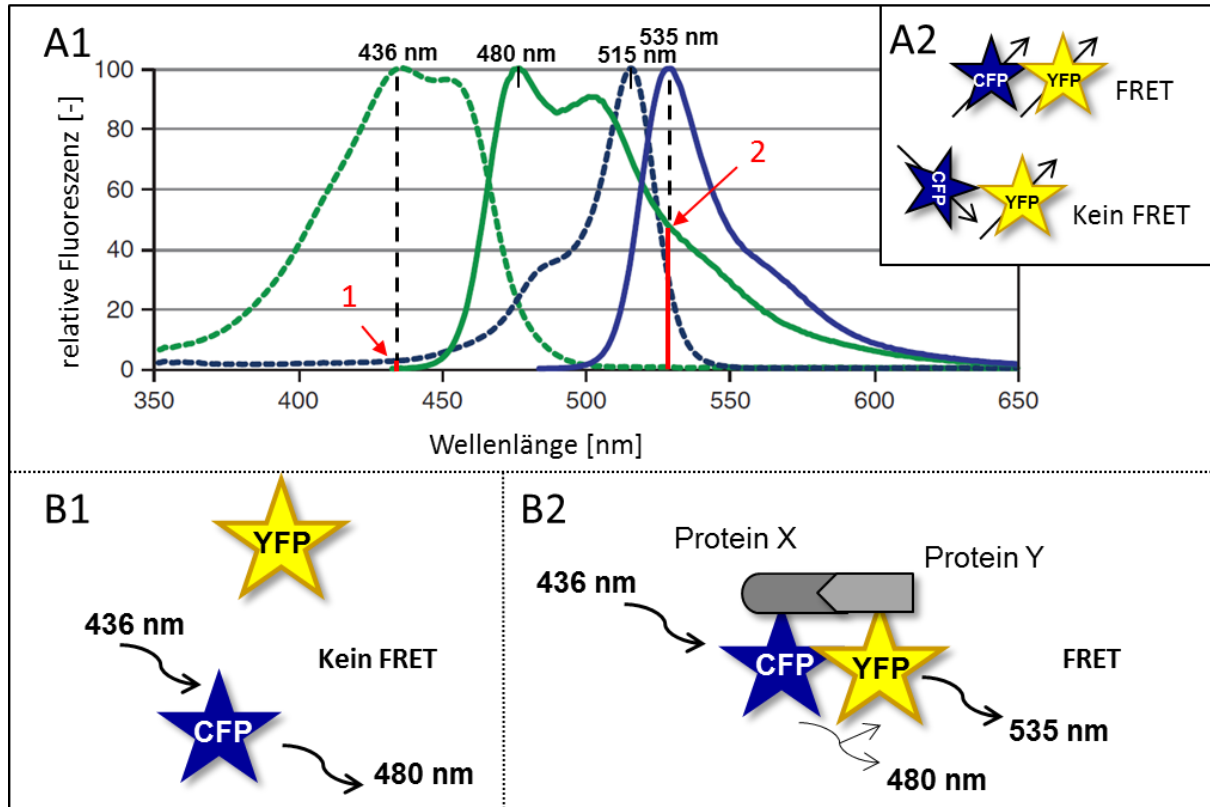


Abb. 26: Prinzip des Förster-Resonanzenergietransfers (FRET). A1: Überlappung der CFP und YFP Spektren: CFP-Anregungsspektrum (grün gestrichelt, Maximum 436 nm), CFP-Emissionsspektrum (grün, Maximum 480 nm), YFP-Anregungsspektrum (blau gestrichelt, Maximum 515 nm), YFP-Emissionsspektrum (blau, Maximum 535 nm). Rote Markierungen: 1: direkte Anregung von YFP durch die Anregung von CFP bei 436 nm. 2: Emission von CFP, die in YFP bzw. FRET Detektion bei 535 nm miteinfließt (Übersprechen). Abbildung verändert nach (Hou *et al.*, 2011). A2: Ein optimaler Energietransfer ist möglich, wenn das Emissionsdipolmoment des Donors und das Anregungsdipolmoment des Akzeptors annähernd parallel zueinander stehen. Nehmen sie einen 90° Winkel zueinander ein, findet kein Energietransfer statt. B1: Sind die Fluorophore CFP und YFP nicht in räumlicher Nähe, kann keine Energieübertragung stattfinden. Bei Anregung von CFP emittiert dieses Licht. YFP bleibt von diesem Vorgang unbeeinflusst. B2: CFP und YFP sind mit interagierenden Proteinen fusioniert und dadurch in räumlicher Nähe. Bei Anregung von CFP geht ein Teil der Energie auf YFP über und hat zur Folge, dass YFP Licht emittiert (FRET-Signal, Maximum 535 nm).

4.2.1.2.1 Konstruktion der FRET-Vektoren

Für die FRET-Untersuchungen wurde das *hemC*- bzw. das *hemD*-Gen aus *B. megaterium* DSM319 mit den Genen der Fluoreszenzproteine YFP bzw. CFP fusioniert (Abb. 27-1, Keller-Hüschemenger, 2012). Dabei wurden die IYFP (Improved Yellow Fluorescence Protein, hier bezeichnet als YFP) und ICFP (Improved Yellow Fluorescence Protein, hier bezeichnet als CFP) Varianten herangezogen, da sich diese im Gegensatz zu YFP und CFP effizient in *B. subtilis* produzieren lassen (Veening *et al.*, 2004). Aufgrund der nahen Verwandtschaft zwischen *B. subtilis* und *B. megaterium* war davon auszugehen, dass dies auch für die Produktion in *B. megaterium* zutrifft, was in unsere Arbeitsgruppe bestätigt wurde (Keller-Hüschemenger, 2012; Klunkelfuß, 2013). Zusätzlich wurden verschiedene

Kontrollvektoren kloniert. Diese bestanden aus Positiv- und Negativkontrollen und Konstrukten, die für die spektroskopische Auswertung der FRET-Methode notwendig waren (Abb. 27-2 bis 7). Die Expression aller Gene stand unter der Kontrolle des Xylose-induzierbaren Promotors.

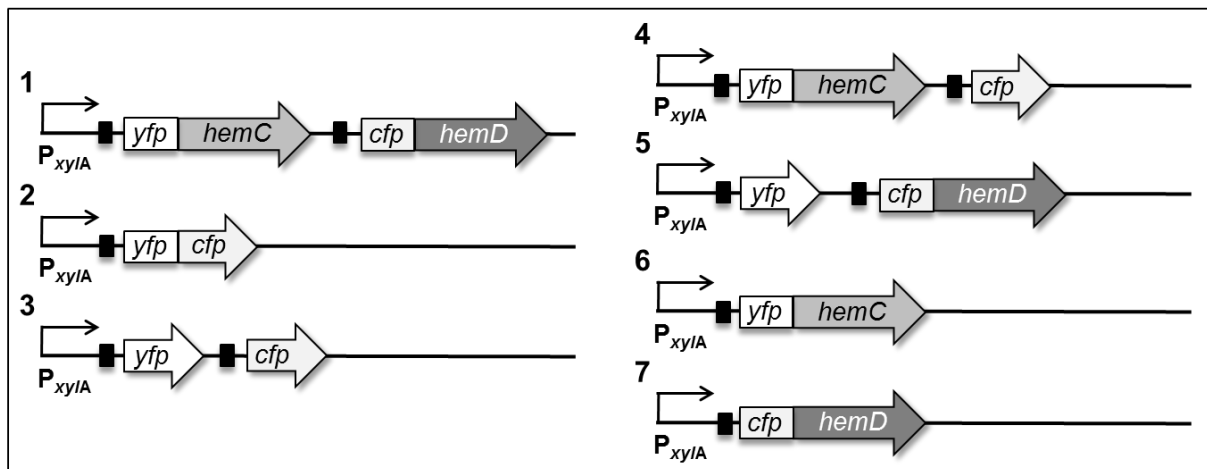


Abb. 27: Vektoren für die Untersuchung der HemC-HemD Wechselwirkung mittels FRET. Die Expression der heterologen Gene, die in Form eines Operons mit einem Promotor und je einer eigenen Ribosomenbindestelle (schwarzes Rechteck) angeordnet sind, steht bei allen Varianten unter der Kontrolle des optimierten Xylose-induzierbaren Promotors (P_{xyIA}^{opt}). 1: pJHBM4. Das *hemC*-Gen ist am 5'-Terminus mit dem *yfp*-Gen fusioniert, das *hemD*-Gen ist am 5'-Terminus mit dem *cfp*-Gen fusioniert. 2: positive Kontrolle, pCFBm49. *yfp* und *cfp* sind fusioniert. 3-5: negative Kontrollen, pCFBm52: Konstrukt für die getrennte Expression von *yfp* und *cfp*. pCFBm50 und pCFBm51: für die Expression beider Fluorophorgene, wobei eines (*yfp* bzw. *cfp*) mit dem Gen von HemC bzw. HemD fusioniert ist. 6, 7: Korrekturvektoren, pCFBm48: Das *hemC*-Gen ist am 5'-Terminus mit dem *yfp*-Gen fusioniert. pJHBM6.CF: Das *hemD*-Gen ist am 5'-Terminus mit dem *cfp*-Gen fusioniert.

4.2.1.2.2 Lokalisierung von YFP-HemC und CFP-HemD in *B. megaterium*

Um visuell festzustellen, ob HemC und HemD in der *B. megaterium* Zelle colokalisiert sind, wurden die Fusionsproteine YFP-HemC und CFP-HemD coproduziert (*B. megaterium* DSM319 transformiert mit pJHBM4 (Abb. 27-1)). Als positive Kontrolle wurde der *B. megaterium* Stamm herangezogen, der das Fusionsprotein YFP-CFP produziert (*B. megaterium* DSM319 transformiert mit pCFBm49 (Abb. 27-2)), während als negative Kontrolle der *B. megaterium* Stamm diente, der die Einzelproteine YFP und CFP enthielt (*B. megaterium* DSM319 transformiert mit pCFBm52 (Abb. 27-3)). Sechs Stunden nach Induktion der Produktion wurden die Zellen der verschiedenen Produktionsstämme geerntet und mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops analysiert.

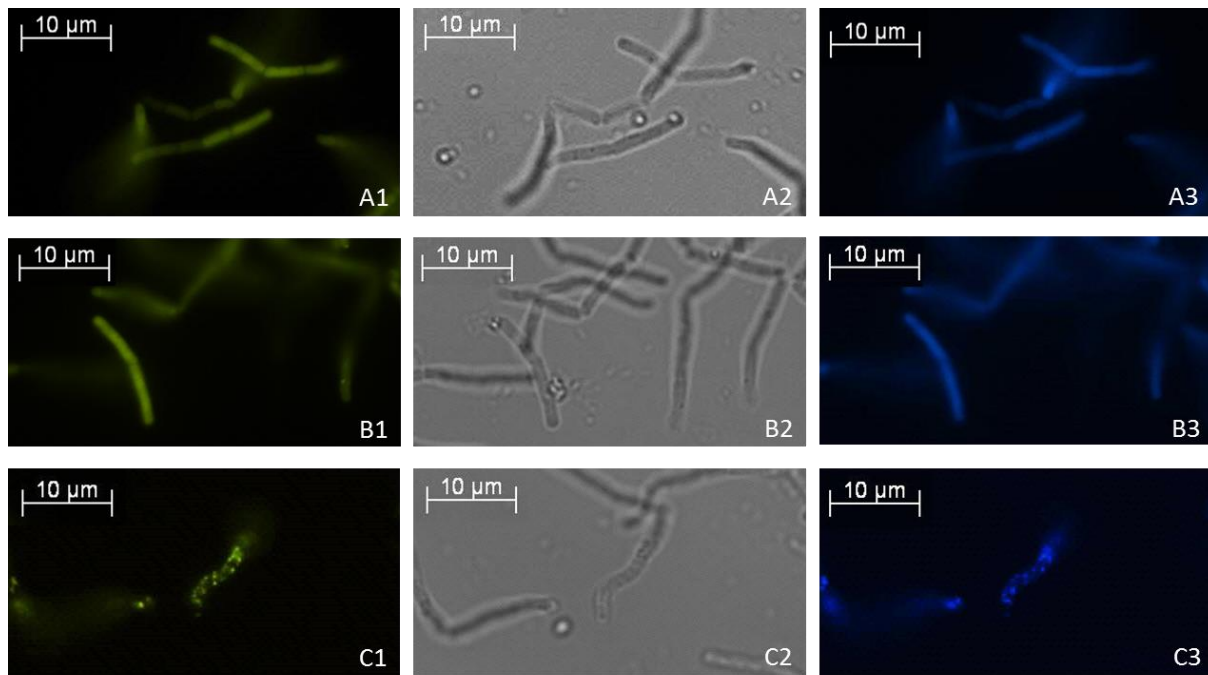


Abb. 28: Lokalisation von YFP-HemC und CFP-HemD in *B. megaterium* DSM319 Zellen. Die entsprechenden *B. megaterium* Plasmidstämme wurden kultiviert. Bei einer OD von 0,4 wurde die Expression der heterologen Gene mit 0,5 % Xylose induziert. Nach 6 h wurden die Zellen geerntet, eine Suspension mit einer OD von 3 eingestellt, diese floureszenzmikroskopisch analysiert (Axiovert 200 M, Carl Zeiss) und Aufnahmen angefertigt (Axio Cam HR, 63x). A: DSM319 transformiert mit pCFBm52 (CFP, YFP einzeln). B: DSM319 transformiert mit pCFBm49 (CFP-YFP Fusion). C: DSM319 transformiert mit pKHBm4 (YFP-HemC, CFP-HemD). 1: Aufnahmen mit YFP-Filter (Filter Set F36-528, AHF Analysetechnik). 2: Hellfeld-Aufnahmen. 3: Aufnahmen mit CFP-Filter (Filter Set F36-544, AHF Analysetechnik).

Die Produktion der Einzelproteine YFP und CFP sowie des YFP-CFP Fusionsproteins ist sehr hoch. Die Proteine sind dicht in der gesamten Zelle verteilt, so dass die Auflösung des Mikroskops nicht ausreichte, um die genaue Lage der Fluorophore zueinander zu bestimmen (Abb. 28 A, B). Durch eine verringerte Induktormenge und eine niedrigere Produktionstemperatur wurde versucht, die Produktion der Fluoreszenzproteine zu verringern. Dies resultierte jedoch in einer nicht mehr detektierbaren Menge der Fluoreszenzproteine (Klunkelfuß, 2012).

Die Produktion von YFP-HemC und CFP-HemD war schwächer, so dass beide Fusionsproteine über die Zelle verteilt und in Ansammlungen vorliegend detektiert werden konnten (punktuelle, intensive Fluoreszenzsignale, Abb. 28 C1 und C3). Auffällig ist, dass die YFP-HemC Ansammlungen deckungsgleich mit den CFP-HemD Ansammlungen zu sein scheinen (Abb. 28 C1 und 3), was auf eine Colokalisierung von YFP-HemC und CFP-HemD hindeutet und damit ein Hinweis auf die Interaktion zwischen HemC und HemD sein könnte.

4.2.1.2.3 Analyse der HemC und HemD Wechselwirkung via FRET

Für die FRET-Analyse sollten entsprechende Proben vermessen und die notwendigen Korrekturen (direkte Anregung, Übersprechen) durchgeführt werden. Um die Korrekturfaktoren zu berechnen, musste zunächst die Konzentration der rekombinanten Proteine in den jeweiligen Proben bestimmt werden. Hierfür wurden die *B. megaterium* DSM319 Plasmidstämme, die einzeln mit den bereits

beschriebenen Konstrukten transformiert worden waren, kultiviert. Die Produktion der rekombinanten Proteine wurde bei einer OD_{578} von 0,4 induziert. Nach sechs Stunden wurden die Zellen geerntet und aufgeschlossen. Nach der Analyse der intrazellulären Proteine per Western Blot mit einem anti-GFP-Antikörper konnte die Proteinkonzentrationsbestimmung mithilfe der Software LabQuant (TotalLab Ltd., Newcastle) erfolgen.

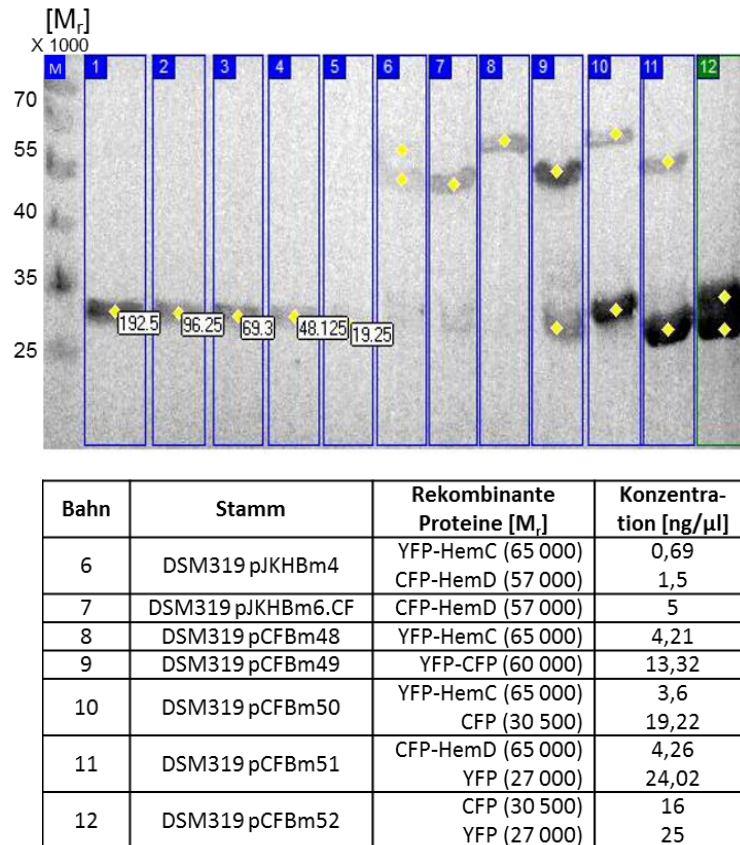


Abb. 29: Western Blot Analyse zur Konzentrationsbestimmung der rekombinanten Proteine. M: Molecular weight marker (Fermentas). Bahn 1-5: Mengenstandard zur Bestimmung der Proteinkonzentration in den zu untersuchenden Proben. Hierfür wurde gereinigtes GFP ($M_r = 28\,000$) eingesetzt. Die GFP-Mengen in ng sind gelb unterlegt. Bahn 6-12: Den entsprechenden Kultivierungen wurden 6 h nach Induktion 3×10^7 Zellen entnommen und mittels Kugelmöhlverfahren (FastPrep®-24, MP Biomedical) aufgeschlossen. Die Proteine im zellfreien Überstand wurden dann über SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran (Merck Millipore, USA) transferiert. Für die Detektion der Fluoreszenzproteine bzw. Fluoreszenzproteininfusionen wurde als Primärantikörper ein anti-GFP-Antikörper (Gabe von A. Nuss, HZI) und als Sekundärantikörper ein mit alkalischer Phosphatase gekoppelter anti-rabbit-Antikörper (Sigma) eingesetzt. Die Quantifizierung erfolgte mithilfe der Software LabQuant (TotalLab Ltd., Newcastle). Die Ergebnisse sind in der Tabelle dargestellt.

Die Produktion der rekombinanten Proteine schwankte stark. Beispielsweise ist YFP-HemC in der Probe DSM319 transformiert mit pKHBm4 nur mit einer Konzentration von 0,69 ng/μl vorhanden, während sich in der Probe DSM319 transformiert mit pCFBm48 4,21 ng/μl dieses Fusionsproteins befinden (Abb. 29 Bahn 6 und Bahn 9). Diese Unterschiede zwischen den Proben können rechnerisch für die FRET-Analyse ausgeglichen werden. Innerhalb einer Probe ist eine rechnerische Angleichung jedoch nicht möglich. Für eine optimale FRET-Analyse sollte das Donor-Akzeptor Verhältnis 1:1 betragen. Je weiter das Verhältnis von diesem Zustand abweicht, desto schwieriger ist es, ein schwaches FRET-Signal vor dem fluoreszierenden Hintergrund der Fluorophore, die nicht am

Energietransfer beteiligt sind, zu messen (Piston & Kremers, 2007). Das CFP-YFP Verhältnis in der Probe DSM319 transformiert mit pKHBm4 beträgt 2:1 (Abb. 29, Bahn 6). In der positiven Kontrolle (DSM319 transformiert mit pCFBm49) kann das Verhältnis nicht genau bestimmt werden, da sich neben dem YFP-CFP Fusionsprotein zusätzlich ein verkürztes Fusionsprotein in der Probe befindet (Abb. 29, Bahn 9). In den negativen Kontrollen sind die CFP-YFP Verhältnisse 5,3 zu 1, 1 zu 5,6 bzw. 1 zu 1,5 (Abb. 29, Bahn 10, 11 und 12).

Für die eigentlichen FRET-Untersuchung wurden 10^7 Zellen (OD_{578} von 1) der entsprechenden Proben sechs Stunden nach Induktion der rekombinanten Proteinproduktion entnommen, in Quarzküvetten überführt und mithilfe des Fluorimeters (Jasco, Easton, US) vermessen. Dabei wurden die Intensitäten bei 535 nm (Emissionswellenlänge von YFP) nach Anregung mit 436 nm (Anregungswellenlänge von CFP) bestimmt (Tab. 18). In Tabelle 18 sind zusätzlich die Faktoren angegeben, die für die Korrektur und damit zur Berechnung von FRET nach folgender Gleichung notwendig sind.

$$I_{\text{Probe}}^H - I_{\text{Ü norm.}}^H - I_{\text{dA norm.}}^H = I_{\text{Probe korr.}}$$

Zunächst wurden alle gemessenen Intensitäten einer Hintergrundkorrektur unterzogen (I^H). Dann wurde das Fluoreszenzsignal der Probe (I_{Probe}) durch Subtraktion der Werte, die durch das Übersprechen ($I_{\text{Ü}}$) bzw. durch direkte Anregung (I_{dA}) zustande kommen, korrigiert ($I_{\text{Probe korr.}}$), wobei $I_{\text{Ü}}$ bzw. I_{dA} entsprechend der YFP- bzw. CFP- Konzentration der zu untersuchenden Probe normiert wurde ($I_{\text{Ü norm.}}$ bzw. $I_{\text{dA norm.}}$). Nimmt $I_{\text{Probe korr.}}$ einen Wert größer null an, so wurde ein FRET-Signal detektiert. Ist dieser kleiner null, fand kein Energietransfer zwischen den Fluorophoren statt.

Tab. 18: Fluoreszenzintensitäten zur Berechnung von FRET. I_{Probe}^H : Intensität der zu untersuchenden Probe (Stämme) bei 535 nm (Emissionswellenlänge des Akzeptors YFP) nach Anregung mit 436 nm (Anregungswellenlänge des Donors CFP), wobei die Intensität der *B. megaterium* DSM319 Zellen (ohne rekombinante Proteine) bei 535 nm nach Anregung mit 436 nm subtrahiert wurden (Hintergrundkorrektur). $I_{\text{Ü norm.}}^H$: Übersprechen-Korrektur, Intensität von YFP (DSM319 transformiert mit pCFBm48) bei 535 nm nach Anregung mit 436 nm, genormt auf die YFP Konzentration in zu untersuchenden Proben nach Abzug der Hintergrundfluoreszenz. $I_{\text{dA norm.}}^H$: direkte Anregung-Korrektur, Intensität von CFP (DSM319 transformiert mit pKHBm6.CF) bei 535 nm nach Anregung mit 436 nm, genormt auf die CFP Konzentration der zu untersuchenden Probe nach Abzug der Hintergrundfluoreszenz. $I_{\text{Probe korr.}}$: Intensität der zu untersuchenden Probe bei 535 nm nach Anregung mit 436 nm und unter Einbeziehung sämtlicher Korrekturfaktoren nach oben genannter Gleichung. Eine Intensität ($I_{\text{Probe korr.}}$) größer null ist gleichzusetzen mit einem FRET-Signal, während bei einer Intensität kleiner null kein FRET-Signal detektiert werden konnte.

Stamm	I_{Probe}^H	$I_{\text{Ü norm.}}^H$	$I_{\text{dA norm.}}^H$	$I_{\text{Probe korr.}}$
DSM319 pKHBm4	266	106	40	>0
DSM319 pCFBm49	770	947	78	<0
DSM319 pCFBm50	1583	1366	212	<0
DSM319 pCFBm51	2583	303	1418	>0
DSM319 pCFBm52	4270	1135	1476	>0

Zwei der drei negativen Kontrollen zeigten ein falsch positives FRET-Signal (Tab. 18, DSM319 transformiert mit pCFBm51 bzw. transformiert mit 52). Auffällig ist, dass in beiden falsch positiven

Proben YFP in hohen Konzentrationen (24,02 bzw. 25 ng/ μ l) vorlag, während in der dritten Probe DSM319 transformiert mit pCFBm50 eine Konzentration von 3,6 ng/ μ l ermittelt wurde (Abb. 29, Bahn 11 bzw. 12). Erstere Proben mussten daher stark verdünnt werden, damit die Messung der Intensität bei 535 nm durchgeführt werden konnte. Aufgrund von Verdünnungsungenauigkeiten wurden möglicherweise die Ergebnisse verfälscht, was zu der falsch positiven FRET-Detektion geführt haben könnte. Auch denkbar wäre, dass durch die starke YFP Produktion und damit hohe Molekülkonzentration in der Zelle falsch positive FRET-Signalen erzeugt wurden, da eine höhere Wahrscheinlichkeit besteht, dass YFP und CFP zufällig in räumliche Nähe kommen (Lalonde *et al.*, 2008).

Die positive Kontrolle zeigte hingegen ein falsch negatives Ergebnis (Tab. 18, DSM319 transformiert mit pCFBm49). Eine Möglichkeit ist, dass das zusätzlich produzierte verkürzte Fluoreszenzprotein (Abb. 29, Bahn 9) eine zu hohe Hintergrundfluoreszenz verursachte und damit das FRET-Signal nicht detektierbar war. Auch denkbar ist, dass durch die Fusion von YFP an CFP die beiden Fluorophore in einem ungünstigen Winkel zueinander stehen, so dass die Dipolmomente des Donors und des Akzeptors nicht parallel ausgerichtet sind und kein Energietransfer stattfinden konnte.

In der Probe mit den Fusionsproteinen YFP-HemC und CFP-HemD konnte ein FRET-Signal gemessen werden. Im Gegensatz zu den anderen Proben war die Produktion der Fusionsproteine recht schwach. Die YFP-HemC bzw. CFP-HemD Konzentration lag bei 0,69 ng/ μ l bzw. 1,5 ng/ μ l (Abb. 29, Bahn 6). Damit ist eine zufällige Kollision der Moleküle unwahrscheinlich. Aufgrund der geringen YFP-HemC Konzentration musste keine zusätzliche Verdünnung der Probe erfolgen. Daher ist davon auszugehen, dass in dieser Probe ein unverfälschtes FRET-Signal detektiert wurde und damit ein weiterer Hinweis erbracht werden konnte, dass HemC und HemD aus *B. megaterium* vermutlich interagieren.

4.2.2 In vitro Interaktionsstudien

Nachdem durch die *in vivo* Untersuchungen Hinweise auf die Interaktion zwischen HemC und HemD aus *B. megaterium* erbracht worden waren, sollte eine Verifizierung durch *in vitro* Methoden erfolgen. Hierfür können affinitätschromatographische Ansätze wie Pulldown und Co-Immunopräzipitation herangezogen werden. Auch ist es möglich, interagierende Proteine im Komplex zu kristallisieren. Zur Durchführung dieser Methoden müssen zum einen die Proteine HemC und HemD in gereinigtem Zustand verfügbar sein, zum anderen sind entsprechende Antikörper gegen diese Proteine notwendig, um die Detektion bzw. im Falle der Co-Immunopräzipitation die spezifische Trennung von anderen Proteinen zu gewährleisten.

4.2.2.1 Rekombinante Produktion von His-HemC und His-HemD aus *B. megaterium* in *E. coli*

Für die rekombinante Produktion von HemC bzw. HemD aus *B. megaterium* DSM509, die N-terminal mit einem His-Tag fusioniert sind, waren bereits entsprechenden Konstrukte (pSD1 bzw. pSD2, Gabe von E. Deery) verfügbar. *E. coli* BL21 (DE3) wurde mit diesen individuell transformiert und bei 37°C in 2 l Flüssigmedium kultiviert. Nach der Induktion der rekombinanten Proteinproduktion bei einer OD₅₇₈ von 0,8 mit 400 µM Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid (IPTG), wurden die Kulturen üN bei 17°C weiter inkubiert (Keller-Hüschemenger, 2012), so dass die Ernte der Zellen und der Zellaufschluss am nächsten Tag erfolgten.

Die affinitätschromatographische Reinigung von His-HemC und His-HemD wurde über eine Säule mit Nickel-beladener Chelating Sepharose Fast Flow (GE Healthcare, GB) Matrix durchgeführt. Nach mehreren Waschschritten wurden die gebundenen Proteine mit 400 mM Imidazol eluiert, wobei die verschiedenen Fraktionen nach Passage durch die Affinitätssäule aufgefangen und mittels SDS-Gelelektrophorese analysiert wurden (Abb. 30).

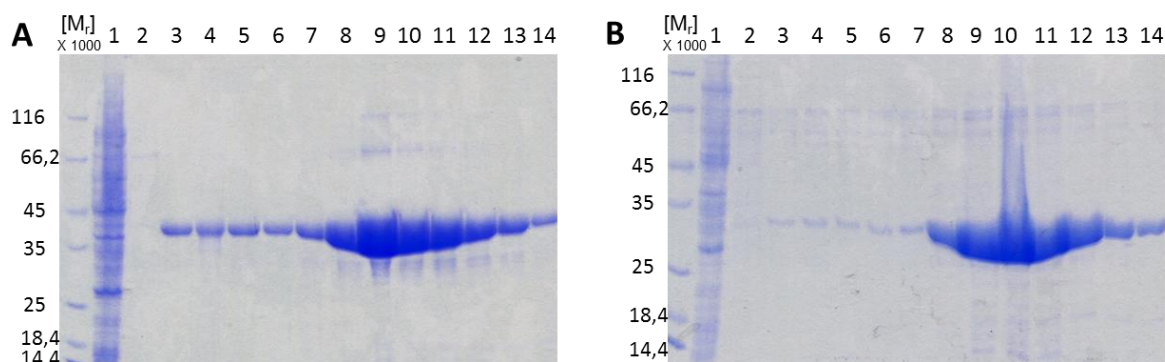


Abb. 30: SDS-PAGE Analyse der affinitätschromatographischen Reinigung von His-HemC und His-HemD. His-HemC bzw. His-HemD wurde in *E. coli* BL21 (DE3) transformiert mit pSD1 bzw. pSD2 produziert. Nach Zellernte und -aufschluss erfolgte die Reinigung von A) His-HemC (M_r = 36 400) und B) His-HemD (M_r = 31 100) über eine Tropfsäule mit einem Nickel-beladenen Sepharosebett (7 ml). Die Fraktionen wurden während der Säulenchromatographie aufgefangen und 5 µl davon 1:1 mit SDS-Probenpuffer versetzt. Nach 5-minütiger Inkubation bei 95°C wurde 2 µl der Proben auf ein 12 % SDS-Gel aufgetragen und aufgetrennt. 1: Durchfluss. 2: Letzte Waschfraktion mit Bindepuffer. 3: Letzte Waschfraktion mit Waschpuffer. 4-14: Elutionsfraktionen. Anschließend wurden die Proteine mit Coomassie Brilliant Blue angefärbt.

Sowohl die Reinigung von His-HemC ($M_r = 36\,400$, Abb. 30 A) als auch von His-HemD ($M_r = 31\,100$, Abb. 30 B) war erfolgreich. Es sind zusätzlich nur sehr schwache Banden im Bereich um die relative molekulare Masse von 66 000 (Abb. 30 A und B) und auf Höhe von 34 000 (Abb. 30 A) zu erkennen. Die Elutionsfraktionen (Abb. 30 E8-E12) wurden vereinigt und die Proteinkonzentration mittels Bradford-Analyse bestimmt. Im Falle von His-HemC konnten Konzentrationen bis zu 40 mg/ml, bei His-HemD bis zu 25 mg/ml erreicht werden. Es fiel auf, dass die His-HemC Elutionsfraktionen eine orange rötliche Färbung aufwiesen, welche sich bei längerer Lagerung vertiefte. Dies kann zum einen auf Oxidation des Dipyrrromethanocofaktors des Enzyms zurückgeführt werden (Azim *et al.*, 2014). Zum anderen war in den Elutionen vermutlich auch das von HemC gebildete Preuroporphyrbinogen vorhanden, welches durch spontane Zyklisierung und anschließender Oxidation farbig wurde (Battersby, 2000).

Die Proteinproben wurden zusätzlich einer Gelpermeationschromatographie (GPC) unterzogen, um die noch verbliebenen Verunreinigungen und etwaige Proteinaggregate zu entfernen. Dabei wurden die Proteine auch umgepuffert (50 mM Tris-HCl pH 8,4, 500 mM NaCl, 400 mM Imidazol zu 20 mM Tris-HCl pH 8,4, 500 mM NaCl), da für spätere Anwendungen wie, beispielsweise die Kristallisation, das Imidazol aus den Proben eliminiert werden sollte.

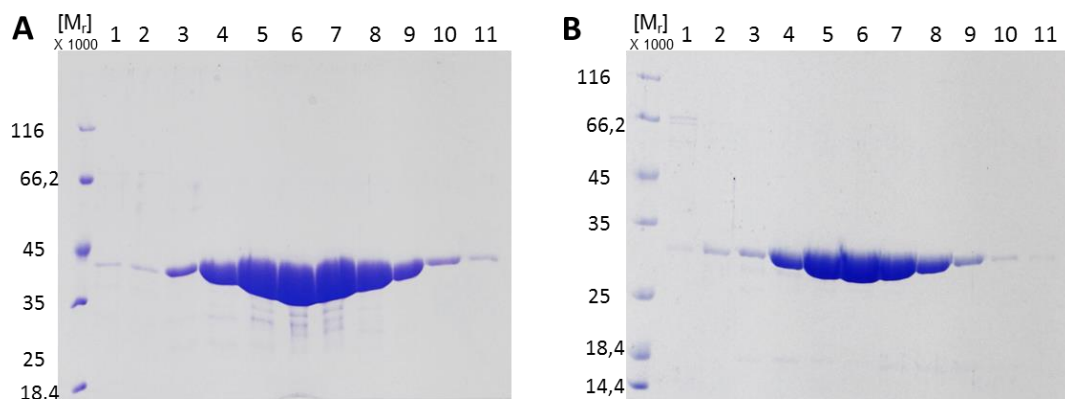


Abb. 31: SDS-PAGE Analyse der gelpermeationschromatographischen Reinigung von His-HemC und His-HemD. Nach der affinitätschromatographischen Reinigung wurden die Proteine A) His-HemC ($M_r = 36\,400$) bzw. B) His-HemD ($M_r = 31\,100$) zusätzlich einer GPC bei 17°C unterzogen. Für die Chromatographie wurde eine Superdex 75 (16/60) Säule an das Äkta Purifier System (GE Healthcare, GB) angeschlossen und die zuvor vereinigten Elutionsfraktionen der Affinitätschromatographie über einen 5 ml Loop auf die Säule aufgebracht. Der Proteingehalt der Elutionsfraktionen wurde bei 280 nm detektiert. Fraktionen, die Protein enthielten, wurden in 2 ml Fraktionen aufgefangen und 5 µl davon 1:1 mit SDS-Probenpuffer versetzt. Nach 5-minütiger Inkubation bei 95°C wurde 2 µl der Proben auf ein 12 % SDS-Gel aufgetragen und aufgetrennt. 1-11. Elutionsfraktionen der Gelpermeationschromatographie. Anschließend wurden die Proteine mit Coomassie Brilliant Blue angefärbt.

Die Reinheit der Proteine His-HemC ($M_r = 36\,400$, Abb. 31, A) und His-HemD ($M_r = 31\,100$, Abb. 31, B) konnte mittels präparativer GPC noch gesteigert werden. Allerdings führte dieser Reinigungsschritt auch zu einer Verringerung der Konzentration um 25 bis zu 50 %. Es konnten Gesamtausbeuten von bis zu 150 mg bzw. 90 mg hochreinem His-HemC bzw. His-HemD erzielt werden. Durch gezielte Optimierung der Pufferbedingungen über Thermofluoranalysen konnte zudem eine hohe Stabilität der Proteine erreicht werden, was eine Lagerung über mehrere Wochen bei -20°C ermöglichte.

4.2.2.2 Herstellung von Antikörpern gegen HemC und HemD

Um die Interaktion zwischen HemC und HemD aus *B. megaterium* nachzuweisen, erschien es wichtig über hochspezifische Antikörper gegen diese Proteine zu verfügen. Diese können sowohl für die Detektion von sehr geringen Proteinmengen im Western Blot als auch zur spezifischen Trennung der Proteine aus komplexen Gemischen herangezogen werden. Zudem ist es möglich, diese mit Goldpartikeln zu markieren, und so eine Lokalisierung in der Zelle mittels Elektronenmikroskopie durchzuführen.

4.2.2.2.1 Monoklonale Antikörper

Die Herstellung der monoklonalen Antikörper, welche sehr spezifisch sind, da sie nur ein Epitop erkennen, wurde von Sabine Buchmeier (Antibody Facility, TU Braunschweig) durchgeführt. Aus der Fusion von Milz-Lymphozyten von zuvor mit den Antigenen (aus *E. coli* gereinigtes His-HemC bzw. His-HemD) immunisierten Mäusen und Myelomazellen entstanden Hybridomazellen, welche monoklonale Antikörper produzieren und sekretieren. Nach Vereinzelung der Hybridomazellen wurden die Kulturüberstände auf funktionale Antikörper gegen die Antigene (His-HemC und His-HemD) mittels ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) überprüft. Die Antikörper wurden in Zusammenarbeit mit Sabine Buchmeier in Western Blot Analysen gegen verschiedene Zellextrakte getestet. Der Zellextrakt von Antigen-produzierenden *E. coli* Stämmen wurde herangezogen, um zu zeigen, dass die Antikörper auch die denaturierte Form der Antigene erkennen und keine Kreuzreaktionen mit anderen Proteinen aufweisen. Der Zellextrakt von einem His-CobJ produzierenden *E. coli* BL21 (DE3) Stamm wurde untersucht, um auszuschließen, dass der His-Tag oder die Linkerregion zwischen His-Tag und HemC bzw. HemD erkannt wird.

Die Sensitivität der so ausgewählten anti-HemC und anti-HemD-Antikörper wurde in unserem Labor über den Zellextrakt von *B. megaterium* DSM509 getestet, in dem die Antigene (HemC bzw. HemD) in ihrer natürlichen Konzentration vorhanden waren. Die Ergebnisse sind in Tabelle 19 zusammengefasst. Die Nomenklatur der Antikörper bezieht sich auf die Klonnummer der Hybridomazelle. Zusätzlich sind die Klassen und Subklassen der Antikörper angegeben, da diese bei der Erkennung über Sekundärantikörper sowie bei der Bindung an Trägermaterialien von Bedeutung sind.

Tab. 19: Generierte Antikörper und ihre Sensitivität gegen HemC bzw. HemD im *B. megaterium* DSM509 Zellextrakt. 1. Spalte: Zeilenmarkierung. 2. Spalte: Name des Antikörpers. 3. Spalte: Klasse und Subklasse des Antikörpers. 4. Spalte: Konzentration der Antikörper im Zellkulturüberstand. 5. Spalte: Western Blot Analyse mit Zellextrakt (100 µl) aus *B. megaterium* DSM509, wobei die Detektion mit unverdünntem Antikörper-enthaltenden Zellüberstand erfolgte. Als Sekundärantikörper wurde ein anti-mouse-Antikörper gekoppelt mit alkalischer Phosphatase (Sigma) eingesetzt. - : kein Signal. + bis +++++ : schwach bis sehr starkes Signal.

Antikörper anti-HemC		Klasse/Subklasse	Konzentration	DSM509
1	3A9	IgM	2 µg/ml	-
2	6C1	IgG ₁	6 µg/ml	-
3	7D8	IgG ₁	6 µg/ml	+
4	7G6	IgG ₁	2 µg/ml	-
Antikörper anti-HemD				
5	3C2	IgG ₁	1,3 µg/ml	++
6	3D1	IgG ₁	2,4 µg/ml	+++
7	5H11	IgG ₁	3,6 µg/ml	+
8	6A1	IgG _{2a}	8 µg/ml	+++++
9	6E10	IgG ₁	4 µg/ml	++++

Die Antikörper gegen HemD zeigten ausnahmslos eine hohe Sensitivität, da sie alle in der Lage sind, HemD im *B. megaterium* DSM509 Zellextrakt zu erkennen (Tab. 19, Spalte 5, Zeile 5-9). Diese Antikörper sind daher für Methoden wie Co-Immunopräzipitation und Lokalisierung mittels Elektronenmikroskopie einsetzbar. Weniger geeignet sind die generierten anti-HemC-Antikörper. Mit 7D8 konnte das native HemC zwar detektiert werden, allerdings wurde nur ein schwaches Signal erzeugt (Tab. 19). Für den Nachweis von überproduzierten HemC waren die anti-HemC-Antikörper jedoch gut anwendbar (Analysen nicht gezeigt).

4.2.2.2.2 Polyklonale Antikörper

Sogenannte polyklonale Antikörper setzen sich aus verschiedenen Antikörpern zusammen, so dass sie mehrere Epitope des Antigens erkennen und damit ein größeres Bindespektrum haben. Die Herstellung dieser Antikörper wurde durch die Firma Metabion durchgeführt. Nachdem jeweils zwei Kaninchen mit den Antigenen (gereinigtes His-HemC bzw. HisHemD) immunisiert worden waren, wurde das Antikörper-enthaltende Serum gewonnen und mittels ELISA auf Spezifität gegen das jeweilige Antigen überprüft. Danach wurden die Antikörper aus den Seren über Chromatographiesäulchen, an deren Trägermaterial His-HemC bzw. His-HemD gekoppelt war, gereinigt. So wurden zwei Chargen gereinigter polyklonaler Antikörper gegen HemC (αC1, αC2) und gegen HemD (αD1, αD2) von Metabion erhalten.

Diese wurden dann in unserem Labor in verschiedenen Konzentrationen gegen den Zellextrakt von *B. megaterium* DSM509 mittels Western Blot Analyse auf ihre Sensitivität getestet (Abb. 32).

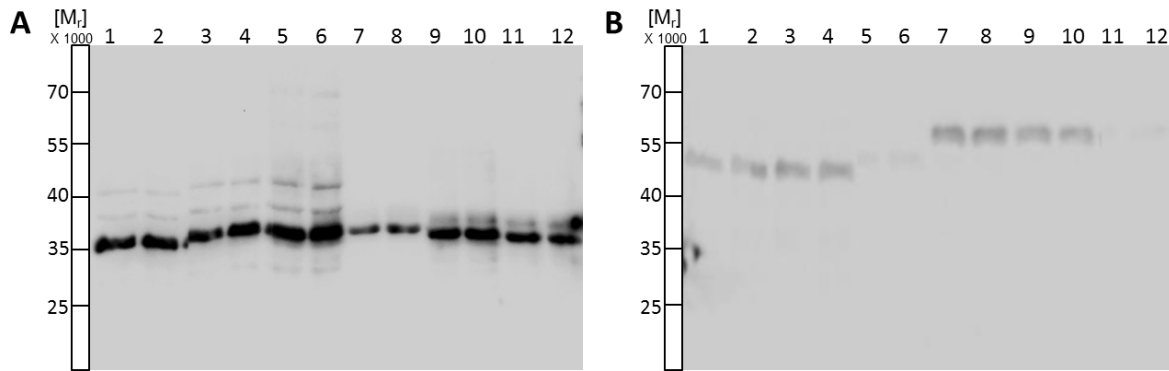


Abb. 32: Western Blot Analyse zur Funktionalität der polyklonalen Antikörper. In den Bahnen 1-12 wurden 10 µl des *B. megaterium* DSM509 Zellextraktes mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Danach wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran (Merck Millipore, USA) übertragen. Die Detektion des nativen HemC bzw. HemD erfolgte durch die polyklonalen Antikörper α C1 und α C2 bzw. α D1 und α D2 in verschiedenen Konzentrationen. Als Sekundärantikörper dienten mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelte anti-rabbit-Antikörper (Gabe der AG Steinert). M: Molecular weight marker (Fermentas) A: Detektion des nativen HemC ($M_r = 34\,000$). 1-6: Polyklonale anti-HemC-Antikörper aus Kaninchen 2, α C2 (UDA/13, 2,71 mg/ml): 1 und 2: Verdünnung 1:10 000. 3 und 4: Verdünnung 1:5 000. 5 und 6: Verdünnung 1:2 000. 7-12: Polyklonale anti-HemC-Antikörper aus Kaninchen 1, α C1 (UDA/13, 3,43 mg/ml): 7 und 8: Verdünnung 1:10 000. 9 und 10: Verdünnung 1:2 000. 11 und 12: Verdünnung 1:5 000. B: Detektion des nativen HemD ($M_r = 29\,000$). 1-6: Polyklonale anti-HemD-Antikörper aus Kaninchen 1, α D1 (CEA/13, 1,82 mg/ml): 1 und 2: Verdünnung 1:3 500. 3 und 4: Verdünnung 1:1.750. 5 und 6: Verdünnung 1:7 000. 7-12: Polyklonale anti-HemD-Antikörper aus Kaninchen 2, α D2 (CEA/13, 1,78 mg/ml): 7 und 8: Verdünnung 1:1 750. 9 und 10: Verdünnung 1:3 500. 11 und 12: Verdünnung 1:7 000.

Beide anti-HemC-Antikörper Chargen (α C1, α C2) erkennen HemC ($M_r = 34\,000$) im Zellextrakt von *B. megaterium* DSM509, auch noch bei einer Verdünnung von 1:10 000, und sind damit hoch sensitiv (Abb. 32 A, Bahn 1, 2, 7, 8). Die Antikörper α C1 sind sehr spezifisch (Abb. 32 A, Bahn 7-12), während α C2 auch unspezifische Bindungen eingeht (Abb. 32 A, Bahn 3-6), die allerdings durch Anpassung der eingesetzten Antikörper-Konzentration minimiert werden können (Abb. 32 A, Bahn 1, 2). Beide Antikörper sind für weitere Anwendungen gut geeignet.

Die Antikörper gegen HemD (α D1, α D2) jedoch erkannten Proteine auf der Höhe von einer relativen molekularen Masse von 50 000 bzw. 60 000, was nicht dem relativen Molekulargewicht von HemD ($M_r = 29\,000$) entspricht (Abb. 32 B, Bahn 1-4 und 7-10). Diese Antikörper zeigen somit Kreuzreaktivität und können nicht eingesetzt werden. Auch durch mehrfache Korrespondenz mit Metabion konnte keine Erklärung für dieses Phänomen gefunden werden.

4.2.2.3 His-HemC-His-HemD Co-Kristallisationsversuche

Die Proteinkristallisation und anschließende Röntgenstrukturanalyse ermöglicht die Aufklärung der dreidimensionalen Proteinstruktur und lässt Rückschlüsse auf die Proteinfunktion wie z.B. den katalytischen Mechanismus bei Enzymen zu. Zudem können auch tiefere Einblicke in Protein-Liganden Wechselwirkung erlangt werden.

Die Kristallstruktur vom humanen HemC, HemC aus *E. coli*, aus *A. thaliana* und auch aus *B. megaterium* konnten bereits gelöst werden (Gill *et al.*, 2009; Song *et al.*, 2009; Louie *et al.*, 1992; Louie *et al.*, 1996; Roberts *et al.*, 2013; Azim *et al.*, 2013). Auch die Strukturen von HemD aus *Homo* und *P. syringae* sind bekannt (Mathews *et al.*, 2001; Moynie *et al.*, 2013); HemD aus *T. thermophilus*

konnte sogar im Komplex mit dem Substrat Uroporphyrinogen III kristallisiert werden (Schubert *et al.*, 2008). Eine Kristallisation von HemC und HemD aus *B. megaterium* DSM509 im Komplex würde die Interaktion der beiden Proteine belegen. Weiterhin wäre es möglich, die entsprechenden Aminosäuren zu identifizieren, die an der Wechselwirkung beteiligt sind.

In einem PreScreen Ansatz (Qiagen) wurden His-HemC und His-HemD in äquimolaren Mengen (150 $\mu\text{M} \approx 5 \text{ mg/ml}$, 300 $\mu\text{M} \approx 10 \text{ mg/ml}$ und 600 $\mu\text{M} \approx 20 \text{ mg/ml}$) eingesetzt und zusätzlich mit einem 40-fachen Überschuss an Porphobilinogen versetzt. Um die Interaktion zwischen beiden Proteinen herbeizuführen, wäre auch die Zugabe des Intermediats Preuroporphyrinogen sinnvoll gewesen, allerdings ist dieses extrem instabil und nicht kommerziell erhältlich, weswegen auf das HemC Substrat Porphobilinogen zurückgegriffen wurde. Porphobilinogen sollte von HemC zu Preuroporphyrinogen umgesetzt und an HemD weitergegeben werden, wenn die Enzymaktivität bei den getesteten Bedingungen nicht eingeschränkt wird. Um eine Vergleichsmöglichkeit zu Kristallen eines Proteines oder Salzkristallen zu haben, wurden zusätzlich Ansätze ohne Protein und mit beiden Proteinen einzeln angesetzt. Alle Ansätze wurden bei 17°C anaerob pipettiert und inkubiert, um eine Oxidation der Enzymsubstrate bzw. -produkte zu vermeiden.

Nach vier Wochen wurde eine erste kristallähnliche Struktur bei einer Proteinkonzentration von je 300 μM His-HemC bzw. His-HemD erhalten (Abb. 33).

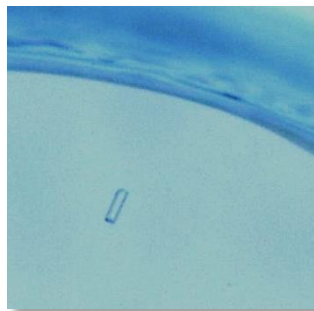


Abb. 33: Co-Kristallisationsansatz mit kristalliner Struktur. Der Kristallisationsansatz wurde anaerob bei 17°C angesetzt. 2 μl des Reservoirpuffers (2 M Ammoniumsulfat, 100 mM Tris pH 8,5) wurde mit 1 μl 300 μM gereinigtem HisHemC und 1 μl 300 μM gereinigtem His-HemD mit 12 mM Porphobilinogen gemischt. Nach elf Tagen konnte die kristallähnliche Struktur detektiert werden (Digital Microscope VHX 500F, Keyence, Hannover).

Dieser Kristall konnte jedoch aufgrund der geringen Größe nicht isoliert und weiteruntersucht werden. Es wurden verschiedene Verfeinerungsbedingungen sowohl aerob bei 4°C als auch anaerob bei 17°C getestet, aber eine Reproduktion blieb erfolglos.

Zusätzlich wurden Index Screen-Platten (Hampton) aerob bei 4°C und anaerob bei 17°C pipettiert. In Kooperation mit Peer Lukat (HZI, Braunschweig) wurden zudem acht weitere Screens (JCSGI-IV, Migas, Index, Morpheus, Protein Complex) mittels eines Pipettierroboters getestet.

Insgesamt sind so 1072 Bedingungen getestet worden. Jedoch wurden bislang keine Kristalle für den His-HemC-His-HemD Komplex entdeckt.

Azim *et al.* (2013) berichtete kürzlich, dass die Kristallisation von HemC aus *B. megaterium* nur nach Entfernung des His-Tags gelang. Damit liegt die Vermutung nahe, dass sich möglicherweise auch bei der Co-Kristallisation die His-Tags der Proteine störend auswirkten. Daher wäre es sinnvoll, die ungetaggtten Formen von HemC und HemD für weitere Co-Kristallisationsversuche einzusetzen. Die Co-Kristallisation von HemC und HemD wird zusätzlich dadurch erschwert, dass die Interaktion transientser Natur und vermutlich nur bei der Übergabe des Intermediats existent ist. Wenn es möglich wäre, die Übergabe zu blockieren, beispielsweise durch einen entsprechenden Inhibitor, so könnte die Co-Kristallisation unter optimalen Bedingungen eventuell gelingen.

4.2.2.4 HemD-HemC Co-Immunopräzipitation

Eine weitere Möglichkeit die Komplexbildung von HemC und HemD aus *B. megaterium* DSM509 nachzuweisen, ist, den intakten Komplex direkt aus dem *B. megaterium* Zellextrakt mittels Antikörper gegen HemC oder HemD zu isolieren. Der Vorteil dieser Methode besteht darin, dass mit nativen Proteinen gearbeitet wird und so kein Affinitätstag nötig ist, der im ungünstigen Fall eine Interaktion der Proteine behindern könnte. Zudem befinden sich die Proteine bis zur Zelllyse im natürlichen System, was möglicherweise die Interaktion begünstigt.

4.2.2.4.1 Einfluss von 5-Aminolävulinsäure auf die native HemC und HemD Produktion bzw. deren Interaktion

Die native Menge an HemC und HemD ist verglichen mit dem Ertrag einer rekombinanten Produktion sehr gering. Daher sollte auf natürliche Weise die Produktion von HemC und HemD stimuliert werden, um ihre Detektion nach der Isolierung mittels Co-Immunopräzipitation zu erleichtern. Es ist bekannt, dass die Zugabe von 5-Aminolävulinsäure (ALA) zur Zellkultur die Produktion von Porphyrinen und die Akkumulation und Sekretion von Coproporphyrin III steigert (Philipp-Dormston & Doss, 1973). Daher sollte zunächst in einem Vorversuch getestet werden, ob der ALA-Zusatz eine erhöhte Konzentration der an der Tetrapyrrolsynthese beteiligten Enzyme, HemC und HemD, bewirkt.

Hierfür wurde *B. megaterium* DSM509 in drei verschiedenen Ansätzen kultiviert, wobei keine ALA, ALA beim Animpfen oder ALA in 1,5 h Intervallen zugegeben wurde. Nach 4 h, 5 h und 6 h wurden Proben entnommen und die löslichen Proteine per Western Blot analysiert. Die Kulturen wurden über Nacht weiter inkubiert und am nächsten Tag photographiert (Abb. 34, A-C).

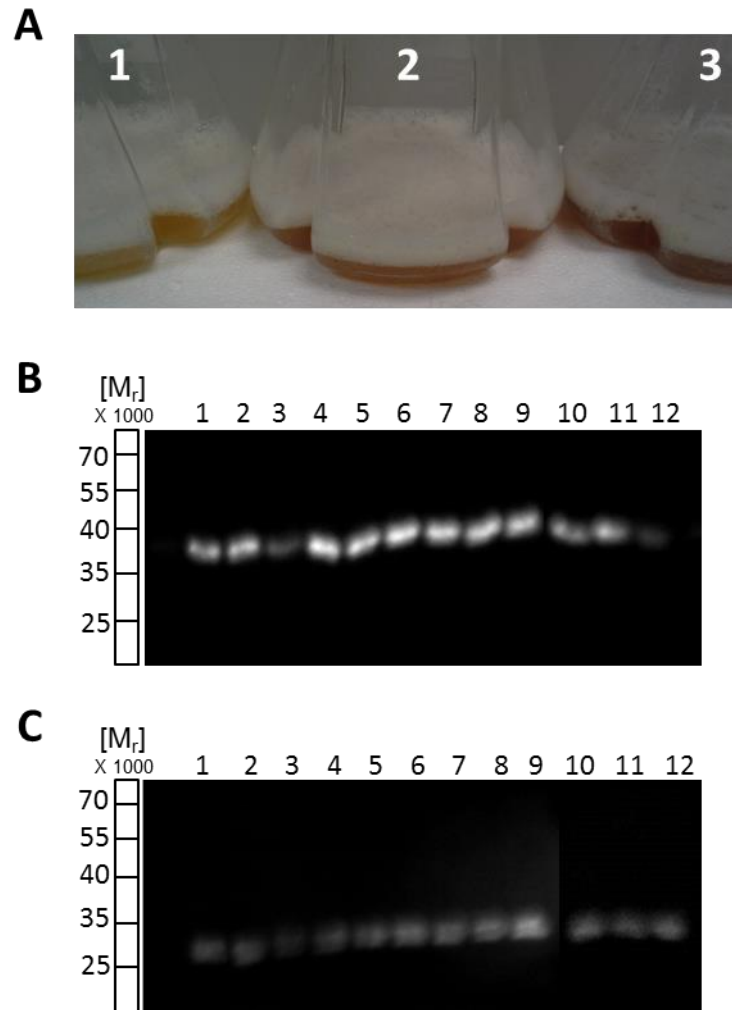


Abb. 34: Effekte von 5-Aminolävulinsäure (ALA) bei Zugabe zu *B. megaterium* DSM509 Kulturen. A): Färbung der Kulturen abhängig vom ALA-Zusatz. Die *B. megaterium* Kulturen wurden schüttelnd bei 37°C in Flüssigmedium üN kultiviert. 1: keine Zugabe von ALA. 2: Einmalige Zugabe von 300 µM ALA beim Animpfen. 3: Mehrmalige Zugabe von 300 µM ALA, wobei die erste beim Animpfen erfolgte und dann noch weitere fünf Mal in 1,5 h Intervallen. B) bzw. C): Western Blot Analyse von HemC ($M_r = 33\,800$) bzw. HemD ($M_r = 29\,000$) verschiedener *B. megaterium* Kulturen zu unterschiedlichen Zeitpunkten. M: Molecular weight marker (Fermentas). Die Proben wurden 4h (1-3), 5h (4-6) und 6h (7-9) nach Animpfen und nach üN-Kultivierung (10-12) entnommen und auf eine OD_{578} von 3 eingestellt. Dann wurden die Zellen mit Hilfe von Lysozym aufgeschlossen. 18 µl (entspricht OD_{578} von 1,35) der löslichen Proteine wurden mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran (Merck Millipore, USA) übertragen. Zur Detektion von HemC bzw. HemD dienten als Primärantikörper $\alpha C1$ (Metabion) bzw. 6A1 (S. Buchmeier, Antibody Facility, TU Braunschweig) und als Sekundärantikörper ein an Meerettich-Peroxidase gekoppelte anti-rabbit-Antikörper bzw. an Meerettich-Peroxidase gekoppelte anti-mouse-Antikörper (beide Gabe der AG Steinert).

Die rötliche Färbung der Kulturen geht auf vermehrt produziertes und sekretiertes Coproporphyrin III zurück und zeigt eine deutliche Korrelation mit dem vermehrten Zusatz von ALA (Abb. 34 A, 1-3), was mit früheren Beobachtung in Einklang steht (Philipp-Dormston & Doss, 1973). Die Unterschiede in der HemC ($M_r = 33\,800$) bzw. HemD ($M_r = 29\,000$) Menge sind hingegen nur gering zwischen den unterschiedlich behandelten Kulturen zu gleichen Zeitpunkten und vermutlich eher auf Schwankungen in der Zellmenge oder Qualität des Zellaufschlusses zurückzuführen (Abb. 34 B bzw. C). Dafür spricht auch, dass bei früheren ALA-Feeding Experimenten in *E. coli* weder eine transkriptionale noch eine posttranskriptionale Regulation des *hemC*- bzw. *hemD*-Gens beobachtet werden konnte (McNicholas *et al.*, 1997). Es ist davon auszugehen, dass bei einer aeroben

Kultivierung der Bedarf an Tetrapyrrolen konstant ist und damit die an der Biosynthese beteiligten Enzyme kontinuierlich in allen Wachstumsphasen produziert werden. Auffällig ist, dass in der Probe, die nach Kultivierung über Nacht entnommen wurde, weniger lösliches HemC bzw. HemD vorzuliegen schien, was vermutlich an der schon teilweise einsetzenden Lyse der *B. megaterium* Zellen lag (Abb. 34, B und C, 10-12).

Da offensichtlich mehr Porphyrine durch den ALA-Zusatz produziert wurden, wäre es vorstellbar, dass HemC und HemD einer höheren Auslastung unterlagen und so die Frequenz der Intermediat-Übergabe gesteigert sein könnte. Dies könnte zu einer Stimulierung der Interaktion zwischen HemC und HemD führen, so dass bei der Kultivierung von *B. megaterium* DSM509 in folgenden Co-Immunopräzipitationsversuchen standardmäßig 5-Aminolävulinsäure zugesetzt wurde.

4.2.2.4.2 Isolierungsversuch des putativen HemD-HemC-Komplexes mittels Co-Immuno-präzipitation

Das Prinzip der Co-Immunopräzipitation beruht darauf, dass Antikörper gegen ein Zielprotein an einem geeigneten Trägermaterial immobilisiert werden. Danach wird der Zellextrakt zugegeben, das Zielprotein durch den Antikörper erkannt und festgehalten. Etwaige Interaktionspartner des Zielproteins binden wiederum an dieses und können dann zusammen mit diesem eluiert werden.

In diesem Versuch wurden Magnetic Beads (Pierce), die mit Protein A/G gekoppelt waren, genutzt. Der Vorteil von Magnetic Beads gegenüber dem Trägermaterial Sepharose ist, dass die Trennung von Puffer und Beads sehr schonend durch Magnetismus erfolgt, wohingegen bei Sepharose Zentrifugationsschritte unumgänglich sind. Da der HemC-HemD-Komplex vermutlich sehr fragil ist, schien eine möglichst schonende Behandlung sinnvoll. Protein A/G (Pierce) ist eine rekombinante Variante von Protein A aus *Staphylococcus aureus* und Protein G aus *Streptococcus* und vereint deren IgG-Bindedomänen. So kann ein breiteres Spektrum von Antikörper aus verschiedenen Spezies und verschiedener Subklassen gebunden werden. Aber nicht nur die Bindung von Antikörper an das Trägermaterial ist von Bedeutung, sondern auch die Eignung des Antikörpers für die Immunopräzipitation des Antigens. Daher wurden die verfügbaren monoklonalen Antikörper getestet, wobei sich zeigte, dass durch den anti-HemD-Antikörper 6A1 (S. Buchmeier, Antibody Facility, TU Braunschweig) die größte Menge an HemD aus dem Zellextrakt gezogen werden konnte (Daten nicht gezeigt). Für die Co-Immunopräzipitation wurden daher die Antikörper 6A1 verwendet und mit Disuccinimidylsuberat (DSS) an ProteinA/G gekoppelt, um eine Verunreinigung der Elutionsfraktion mit Antikörpern zu verhindern. *B. megaterium* DSM509 wurde schüttelnd bei 37°C in Flüssigkultur kultiviert. Der Zusatz von ALA erfolgte nach 3, 4,5 und 5,5 h. 6 h nach Kultivierungsstart wurden die Zellen geerntet und durch Ultraschall aufgeschlossen. Der Zellextrakt wurde dann mit den präparierten Magnetic Beads inkubiert, wobei Porphobilinogen zugesetzt wurde, um die Interaktion zwischen HemC und HemD zusätzlich anzuregen. Daraufhin folgten mehrere

Waschschritte und die Elution der gebundenen Proteine mit Glycinpuffer pH 2. Die Proteine der Elutionsfraktionen wurden mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und über einen Western Blot analysiert (Abb. 35).

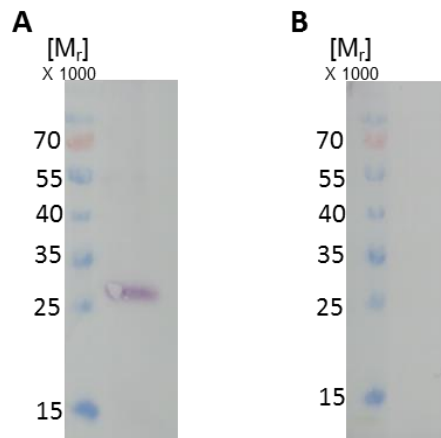


Abb. 35: Western Blot Analyse der Co-Immunopräzipitation. Nach der Inkubation des Zellextrakts von *B. megaterium* DSM509 üN bei 4°C und am nächsten Tag 20 min bei 37°C mit den anti-HemD-Antikörper (6A1, S. Buchmeier, Antibody Facility, TU Braunschweig) beladenen Magnetic Beads und mehreren Waschschritten wurden die gebundenen Proteine mit Glycinpuffer pH 2 eluiert. Die Elutionen aus mehreren Ansätzen wurden vereinigt und konzentriert (Zentrifugationsfilter, Amicon®). Anschließend wurden die Proteine mittels SDS-Gelelektrophorese getrennt und auf eine PVDF-Membran (Merck Millipore, USA) überführt. A): Nachweis von nativem HemD ($M_r = 29\,000$) in der Elutionsfraktion. Als Primärantikörper diente 6A1 und als Sekundärantikörper wurde ein mit alkalischer Phosphatase gekoppelter anti-mouse-Antikörper (Sigma) verwendet. B): Nachweis von nativem HemC ($M_r = 33\,900$) in der Elutionsfraktion. Als Primärantikörper diente 7D8 (S. Buchmeier, Antibody Facility, TU Braunschweig) und als Sekundärantikörper wurde ein mit alkalischer Phosphatase gekoppelter anti-mouse-Antikörper (Sigma) verwendet.

Das native HemD ($M_r = 29\,000$) konnte in der Elutionsfraktion detektiert werden (Abb. 35 A). Es war also gelungen, mithilfe der anti-HemD-Antikörper 6A1 HemD aus dem Zellextrakt herauszuziehen. Die Ertragsmenge war jedoch gering. Da vermutlich die Interaktion zwischen HemC und HemD transient ist und nur während der Übergabe des Intermediates (Preuroporphyrinogen) Bestand hat, sollte die Menge an HemC, die zusammen mit HemD isoliert werden konnte, noch geringer sein als die des HemD. So konnte das native HemC weder durch die monoklonalen anti-HemC-Antikörper 7D8 (Abb. 35, B) noch durch die sensitiveren polyklonalen Antikörper ($\alpha C1$) in derselben Fraktion nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Falls interagierendes HemC eluiert worden war, lag dessen Menge unterhalb der Detektionsgrenze.

Aufgrund der geringen Ausbeute an nativem Protein und des dynamischen Charakters der nachzuweisenden Interaktion konnte mit dieser Nachweismethode kein Hinweis zur Wechselwirkung zwischen HemC und HemD erzielt werden.

4.2.2.5 His-HemC+HemD Pulldownversuche

Da sich im Co-Immunopräzipitationsversuch gezeigt hatte, dass die Proteinmengen ein limitierender Faktor für den Nachweis der Interaktion zwischen HemC und HemD war, wurde als Alternative die Pulldown-Methode herangezogen.

Das Verfahren beruht darauf, dass eines der auf Interaktion zu untersuchenden Proteine mit einem Affinitätstag, das andere hingegen ohne Tag überproduziert wird. Wird der Zellextrakt mit diesen Proteinen über eine geeignete Affinitätssäule gegeben, bindet das getaggte Protein an die Säule und das interagierende Protein wiederum an das getaggte Protein. Beide Proteine können dann in der Elutionsfraktion detektiert werden. Um auszuschließen, dass der potentielle Interaktionspartner ohne Tag unspezifisch am Säulenmaterial bindet, wird derselbe Versuch mit einem Zellextrakt durchgeführt, der nur das ungetaggte Protein enthält, welches ungebunden die Säule passieren und nicht in der Elutionsfraktion nachweisbar sein sollte.

Für diesen Versuch wurden die Gene *hemC* und *hemD* aus *B. megaterium* DSM509 in den Vektor pETDuet-1 (Novagen) kloniert, wobei *hemC* mit der im Vektor kodierten His-Tag-Sequenz fusioniert wurde (pETDuet-*hishemC-hemD*). Die Expression *his-hemC* und von *hemD* steht jeweils individuell unter der Kontrolle eines induzierbaren T7-Promotors, um so zu gewährleisten, dass die Coexpression beider Gene in äquivalenter Menge erfolgt. Zusätzlich wurde ein Kontrollvektor erstellt, der nur das Gen *hemD* enthielt (pETDuet-*hemD*).

E. coli BL21 (DE3) wurde einzeln mit diesen Vektoren transformiert und bei 37°C kultiviert. Nach der Induktion der rekombinanten Proteinproduktion bei einer OD₅₇₈ von 0,8 mit 400 µM IPTG wurden die Kulturen üN bei 17°C weiter inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Kulturen 1h vor Ernte der Zellen mit 300 µM ALA versetzt. Danach erfolgte der Zellaufschluss. Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation sedimentiert und die Zellextrakte, die die rekombinanten Proteine His-HemC und HemD bzw. nur HemD enthielten, wurden auf jeweils eine Sepharosesäule überführt. Da sich in vorangehenden Versuchen gezeigt hatte, dass HemD unspezifisch mit Ni²⁺-beladenen Säulen interagiert, wurde in den Pulldown Experimenten standardmäßig Co²⁺-beladene Sepharosesäulen eingesetzt.

Danach wurde die Säule mehrmals gewaschen und anschließend die auf der Säule verbliebenen Proteine mit ansteigender Imidazolkonzentration eluiert. Nach der Passage wurden die Fraktionen aufgefangen und mittels Western Blot Analyse untersucht (Abb. 36).

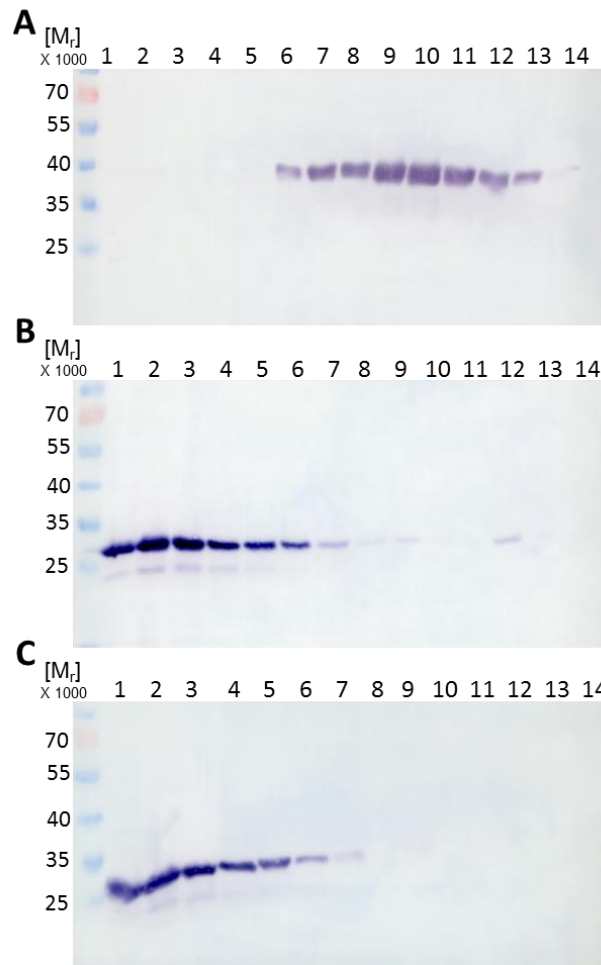


Abb. 36: Western Blot Analyse des Pull-down-Versuchs. *E. coli* BL21 (DE) transformiert mit pETDuet-1*hishemC-hemD* bzw. pETDuet-1*hemD* wurden bei 37°C inkubiert. Bei einer OD₅₇₈ von 0,8 wurde in beiden Plasmidstämmen die heterologe Genexpression mit 400 µM IPTG induziert. Nach Zellernte und -aufschluss wurde der zellfreie Extrakt auf Co²⁺-Säulen aufgebracht. Nach mehreren Waschschritten erfolgte die Elution der Proteine über einen Imidazolgradienten (10-400 mM). Die Fraktionen wurden aufgefangen, die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran (Merck Millipore, USA) übertragen. Die Detektion erfolgte mittels entsprechender Antikörper. A): Fraktionen der Säule, die mit BL21 (DE) pETDuet-1*hishemC-hemD* Zellextrakt beladen worden war. Als Primärantikörper wurde der anti-HemC-Antikörper 5H11 (S. Buchmeier, Antibody Facility, TU Braunschweig) verwendet, als Sekundärantikörper ein mit alkalischer Phosphatase gekoppelter anti-mouse-Antikörper (Sigma). B): wie A). Als Primärantikörper wurde der anti-HemD-Antikörper 6A1 (S. Buchmeier, Antibody Facility, TU Braunschweig) verwendet, als Sekundärantikörper diente ein mit alkalischer Phosphatase gekoppelter anti-mouse-Antikörper (Sigma). C): Fraktionen der Säule, die mit BL21 (DE) pETDuet-1*hemD* Zellextrakt (Kontrolle) beladen worden war. Als Primärantikörper wurde der anti-HemD-Antikörper 6A1 (S. Buchmeier, Antibody Facility, TU Braunschweig) verwendet, als Sekundärantikörper ein mit alkalischer Phosphatase gekoppelter anti-mouse-Antikörper (Sigma). M: Molecular weight marker (Fermentas). 1 und 2: Durchflussfraktionen. 3-5: Waschfraktionen mit 10 mM Imidazol. 6-8: Elutionsfraktionen mit 50 mM Imidazol. 9-11: Elutionsfraktionen mit 100 mM Imidazol. 12-14: Elutionsfraktionen mit 400 mM Imidazol.

His-HemC wurde an die Co²⁺-Säule gebunden und konnte erst mit steigender Imidazolkonzentration von der Säule eluiert werden (Abb. 36 A, Bahn 6-14). Das überproduzierte HemD derselben Probe passierte die Säule ohne zu binden (Abb. 36 B, Bahn 1, 2) und wurde nach und nach bei weiteren Wasch- bzw. Elutionsschritten von der Säule gewaschen (Abb. 36 B, Bahn 3-7) bis sich zunächst kein HemD mehr in den Elutionsfraktionen befand (Abb. 36 B, Bahn 10 und 11). Sehr ähnlich verhielt sich HemD ohne gekoppeltes HemC im Kontrollzellextrakt (Abb. 36 C). Allerdings konnte in Fraktion 12 der Pull-down-Probe wieder HemD detektiert werden (Abb. 36 B, Bahn 12), wohingegen es in der

Kontrollelutionsfraktion nicht nachweisbar war (Abb. 36 C, Bahn 12). Daher ist nicht von einer unspezifischen Bindung von HemD an die Säule auszugehen, sondern, dass HemD mit His-HemC interagiert und so zusammen mit diesem eluiert werden konnte. Dieses Ergebnis konnte mehrmals reproduziert werden.

Üblicherweise werden Interaktionspartner bei dieser Methode in einem nahezu gleichen Verhältnis eluiert. Hier ist die HemD Menge jedoch um ein Vielfaches geringer als die des His-HemCs (vgl. Abb. 36 A, Bahn 12 und B, Bahn 12). Dies könnte darin begründet sein, dass die Interaktion zwischen HemC und HemD nur transienter Natur zu sein scheint, d.h. dass sehr viel mehr HemD-Proteine einzeln vorlagen als im Komplex. Weiterhin fiel auf, dass sich das interagierende HemD nicht in derjenigen Elutionsfraktion befand, die die größte Menge an His-HemC enthielt (Abb. 36 A, Bahn 10). Es ist anzunehmen, dass der Komplex bestehend aus His-HemC und HemD ein anderes Laufverhalten in der Säule aufwies als die Einzelproteine, weswegen beide Proteine erst in einer späteren Fraktion nachgewiesen werden konnten.

Nachdem die Untersuchungen der Wechselwirkung zwischen HemC und HemD mittels Co-Immunopräzipitation vermutlich aufgrund des Detektionslimits an ihre Grenzen gestoßen waren, war es jedoch durch die Überproduktion beider Proteine und deren Co-Reinigung möglich, die Theorie, dass HemC und HemD interagieren, noch weiter zu bekräftigen, worauf zuvor bereits die BACTH-Ergebnisse und die FRET-Analyse hingewiesen hatten.

5 Zusammenfassung

In den letzten Jahren wurde *Bacillus megaterium* als Wirt für die Produktion rekombinanter Proteine stetig verbessert. Trotzdem bestehen Limitierungen. So verringert eine schlechte Codonanpassung eines rekombinanten Gens die Menge an rekombinatem Protein. Daher wurde im ersten Teil dieser Arbeit der Einfluss coexprimierter *tRNA*-Gene auf die rekombinante Proteinproduktion in *B. megaterium* untersucht. Mit einem artifiziellen Codontestsystem mit dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) als Reporter konnte gezeigt werden, dass durch Coexpression von seltenen *tRNA*-Genen ($tRNA_{\text{ACC}}^{\text{Thr}}$, $tRNA_{\text{CGG}}^{\text{Arg}}$ und $tRNA_{\text{GCC}}^{\text{Ala}}$) der negative Einfluss von Clustern gleicher seltener oder favorisierter Codons im 5'-Bereich des *gfp*-Gens eliminiert und die rekombinante Produktion sogar bis zu 4,2-fach verbessert werden konnte. Darauf aufbauend konnte gezeigt werden, dass die Coexpression von einzelnen und mehreren seltenen *tRNA*-Genen die Produktion von rekombinanten intra- (Formiatdehydrogenase) und extrazellulären (Hydrolase) Proteinen, deren Gensequenz nativ und codonoptimiert vorlag, beeinflusst. Neben der Inhibierung des Wachstums durch starke metabolische Belastung, verringerter oder unveränderter Produktion konnte die rekombinante Produktion bis zu 18-fach, unabhängig von der Sequenz des Gens, gesteigert werden. Abschließend konnte in dieser Arbeit erstmals durch Coexpression von *tRNA*-Genen, die seltene Codons bedienen, neben der Produktion rekombinanter Proteine auch die generelle Translationseffizienz in *B. megaterium* erhöht werden und somit die Grundlage für einen *B. megaterium* Stamm mit verbesserter Produktionskapazität geschaffen werden.

Seit langem wird spekuliert, dass zwei aufeinanderfolgende Proteine der Tetrapyrrolbiosynthese, die Porphobilinogen-desaminase (HemC) und die Uroporphyrinogen-III-Synthase (HemD) einen Komplex bilden, um das labile Produkt von HemC, Preuroporphyrinogen, direkt an das Folgeenzym, HemD, weiterzugeben. In dieser Arbeit konnten über *in vivo* Analysen (Bacterial Two-Hybrid Assay in *E. coli* und Förster-Resonanzenergietransfer in *B. megaterium*) mit den Enzymen HemC und HemD aus *B. megaterium* Hinweise auf eine Interaktion erlangt werden. Für darauf folgende sensitive *in vitro* Analysen wurden die Proteine erfolgreich in großen Mengen in *E. coli* hergestellt und zu hoher Reinheit gereinigt. Cokristallationsansätze und mithilfe von generierten monoklonalen bzw. polyklonalen Antikörpern durchgeführte Co-Immunoprecipitationsversuche konnten die Hinweise aus den *in vivo* Analysen zunächst nicht bestätigen, was jedoch mit Pulldownexperimenten möglich war. Somit bestätigt diese Arbeit eindeutig die Spekulation der Komplexbildung zwischen HemC und HemD.

6 Summary

In the last few years *Bacillus megaterium* was stepwise established as a host for the production of recombinant proteins. However, some limitations are still obvious. When observing the translation process a poorly adapted codon composition of a recombinant gene results in no or low recombinant protein yield. Consequently, in the first part of this work the influence of *tRNA*-genes on recombinant protein production in *B. megaterium* was analysed. Using an artificial codon test system with the green fluorescent protein (GFP) as reporter coexpression of rare *tRNA*-genes (*tRNA*^{Thr}_{ACC}, *tRNA*^{Arg}_{CGG} und *tRNA*^{Ala}_{GCC}) was shown to eliminate the negative influence of a cluster consisting of four rare or favoured codons introduced to the 5'-terminus of *gfp* and even led up to a 4.2 times increased recombinant protein production. Further, it could be shown that the coexpression of one or several rare *tRNA*-genes influences the production of recombinant intra- (formate dehydrogenase) and extracellular (hydrolase) proteins encoded by their native or codon-optimized gene sequence. Besides inhibition of growth due to a strong metabolic burden, the recombinant protein production was reduced, unchanged or could be increased up to 18 times, independent of the gene's sequence. So for the first time the coexpression of *tRNA*-genes, whose gene products serve rare codons, was shown to result in both an increased production of recombinant proteins and in an increased general translational efficiency in *B. megaterium*. Thus, the basis for a *B. megaterium* strain with an enhanced protein production capacity was laid.

For a long time there are speculations that the proteins uroporphobilinogen desaminase (HemC) and uroporphyrinogen-III-synthase (HemD) involved in tetrapyrrole biosynthesis form a protein complex to directly channel the instable product of HemC, preuroporphyrinogen, to the following enzyme HemD. In this work, clear indications for the interaction of the *B. megaterium* HemC and HemD could be obtained by *in vitro* analysis (bacterial two-hybrid in *E. coli* and Förster resonance energy transfer in *B. megaterium*). For subsequent *in vitro* analysis the proteins could be successfully produced and purified to a great extent. Although the co-crystallization and co-immunoprecipitation experiments utilizing generated mono- and polyclonal antibodies failed to confirm the evidence obtained from the *in vivo* analysis, the pulldown experiments could also show the interaction. Hence, in this work the speculation of the complex formation between HemC and HemD has been verified.

7 Ausblick

Die Ergebnisse des ersten Teils dieser Arbeit zeigen, dass die Coexpression von seltenen *tRNA*-Genen eine positive Auswirkung auf die rekombinante Proteinproduktion haben kann. So wurde die Grundlage für einen plasmidbasierten *tRNA*-plus *B. megaterium* Stamm gelegt. Für eine Weiterentwicklung könnte

- die Coexpression weiterer seltener *tRNA*-Gene wie beispielsweise *tRNA*^{Val}_{GUC} untersucht und weitere Kombinationen von seltenen *tRNA*-Genen getestet werden,
- die Coexpression anderer, nicht seltener *tRNA*-Gene untersucht werden, da sich diese möglicherweise steigend auf die globale Translationseffizienz auswirken sowie
- die Klonierung von *tRNA*-Genen in low bzw. high copy Plasmide erfolgen, um zu untersuchen, ob dies noch eine weitere Steigerung der rekombinanten Proteinproduktion hervorruft

Um den Einfluss der coexprimierten *tRNA*-Gene genauer zu erklären, wäre weiterhin von Interesse, die Genproduktmenge der coexprimierten *tRNA*-Gene in der *B. megaterium* Zelle beispielsweise über qRT-PCR zu bestimmen.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit konnte die Interaktion zwischen HemC und HemD aus *B. megaterium* durch Pulldownexperimente zwar gezeigt und Hinweise auf die Interaktion durch BACTH und FRET erhalten werden, jedoch scheint eine Verifizierung durch eine weitere Methode notwendig. Im Hinblick auf den transienten Charakter dieser Interaktion, wären Methoden, die gleichzeitig zur Stabilisierung des Komplexes beitragen hilfreich.

Möglichkeiten zur Bestätigung der HemC-HemD Interaktion:

- in Ergänzung der FRET Methode die Anwendung der split-YFP Methode, bei der transiente Protein-Protein Interaktionen durch die Rekonstitution des YFPs stabilisiert werden können,
- Fortführung der Co-Kristallisationsversuche der Enzyme (1) ohne His-Tag, (2) mit Einsatz entsprechender Inhibitoren oder (3) mit Einführung von Mutationen in die Enzyme, um eine Dissoziation des Protein-Protein Komplexes zu verhindern.
- der Einsatz weiterer Methoden wie Gradientenultrazentrifugation, Biacore (basierend auf SPR) oder Microscale Thermophorese (Nanotemper)

8 Literaturverzeichnis

- Agris, P. (1991).** Wobble position modified nucleosides evolved to select transfer RNA codon recognition: A modified-wobble hypothesis. *Biochimie* **73**, 1345–1349.
- Agris, P. F., Vendeix, F. A. & Graham, W. D. (2007).** tRNA's wobble decoding of the genome: 40 years of modification. *J Mol Biol* **366**, 1–13.
- Ailor, E., Pathmanathan, J., Jongbloed, J. D. & Betenbaugh, M. J. (1999).** A bacterial signal peptidase enhances processing of a recombinant single chain antibody fragment in insect cells. *Biochem Biophys Res Commun* **255**, 444–450.
- Akhtar, M. (1991).** Chapter 2 "Mechanism and stereochemistry of the enzymes involved in the conversion of uroporphyrinogen III into haem". In *Biosynthesis of tetrapyrroles*, pp. 67–99: Elsevier.
- Anderson, P. M. & Desnick, R. J. (1980).** Purification and properties of uroporphyrinogen I synthase from human erythrocytes. Identification of stable enzyme-substrate intermediates. *J Biol Chem* **255**, 1993–1999.
- Angov, E. (2011).** Codon usage: Nature's roadmap to expression and folding of proteins. *Biotechnol J* **6**, 650–659.
- Angov, E., Hillier, C. J., Kincaid, R. L. & Lyon, J. A. (2008).** Heterologous protein expression is enhanced by harmonizing the codon usage frequencies of the target gene with those of the expression host. *PLoS One* **3**, e2189.
- Avissar, Y. J. & Moberg, P. A. (1995).** The common origins of the pigments of life-early steps of chlorophyll biosynthesis. *Photosyn Res* **44**, 221–242.
- Awan, S. J., Siligardi, G., Warren, M. J. & Shoolingin-Jordan, P. M. (1997).** Discovery of a novel mechanism for cofactor assembly by *Escherichia coli* porphobilinogen deaminase. *Biochem Soc Trans* **25**, 79S.
- Azim, N., Deery, E., Warren, M. J., Erskine, P., Cooper, J. B., Wood, S. P. & Akhtar, M. (2013).** Crystallization and preliminary X-ray characterization of the tetrapyrrole-biosynthetic enzyme porphobilinogen deaminase from *Bacillus megaterium*. *Acta Crystallogr F Struct Biol Cryst Commun* **69**, 906–908.
- Azim, N., Deery, E., Warren, M. J., Wolfenden, B. A. A., Erskine, P., Cooper, J. B., Coker, A., Wood, S. P. & Akhtar, M. (2014).** Structural evidence for the partially oxidized dipyrromethene and dipyrromethanone forms of the cofactor of porphobilinogen deaminase: Structures of the *Bacillus megaterium* enzyme at near-atomic resolution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **70**, 744–751.
- Baca, A. M. & Hol, W. G. (2000).** Overcoming codon bias: A method for high-level overexpression of *Plasmodium* and other AT-rich parasite genes in *Escherichia coli*. *Int J Parasitol* **30**, 113–118.
- Banerjee, R., Chen, S., Dare, K., Gilreath, M., Praetorius-Ibba, M., Raina, M., Reynolds, N. M., Rogers, T., Roy, H., Yadavalli, S. S. & Ibba, M. (2010).** tRNAs: Cellular barcodes for amino acids. *FEBS Lett* **584**, 387–395.
- Battle, A. M. C. & Rossetti, M. V. (1977).** Enzymic polymerization of porphobilinogen into uroporphyrinogens. *Int J Biochem* **8**, 251–267.
- Battersby, A. R. (1978a).** Ideas and experiments in biosynthesis. *Ciba Found Symp*, 25–51.
- Battersby, A. R. (1978b).** The discovery of nature's biosynthetic pathways. *Experientia* **34**, 1–13.
- Battersby, A. R. (1988).** Biosynthesis of the pigments of life. *J Nat Prod* **51**, 629–642.
- Battersby, A. R. (2000).** Tetrapyrroles: The pigments of life. *Nat Prod Rep* **17**, 507–526.
- Battersby, A. R., Fookes, C. J., Matcham, G. W. & McDonald, E. (1980).** Biosynthesis of the pigments of life: Formation of the macrocycle. *Nature* **285**, 17–21.

- Battersby, A. R., Fookes, C. J. R., McDonald, E. & Meegan, M. J. (1978).** Biosynthesis of type-III porphyrins: Proof of intact enzymic conversion of the head-to-tail bilane into uroporphyrinogen-III by intramolecular rearrangement. *J Chem Soc, Chem Commun*, 185.
- Battersby, A. R. & Leeper, F. J. (1990).** Biosynthesis of the pigments of life: Mechanistic studies on the conversion of porphobilinogen to uroporphyrinogen III. *Chem Rev* **90**, 1261–1274.
- Battesti, A. & Bouveret, E. (2012).** The bacterial two-hybrid system based on adenylate cyclase reconstitution in *Escherichia coli*. *Methods (San Diego, Calif.)* **58**, 325–334.
- Bäumchen, C., Roth, A. H. F. J., Biedendieck, R., Malten, M., Follmann, M., Sahm, H., Bringer-Meyer, S. & Jahn, D. (2007).** D-Mannitol production by resting state whole cell biotransformation of D-fructose by heterologous mannitol and formate dehydrogenase gene expression in *Bacillus megaterium*. *Biotechnol J* **2**, 1408–1416.
- Beale, S. I., Gough, S. P. & Granick, S. (1975).** Biosynthesis of 5-aminolevulinic acid from the intact carbon skeleton of glutamic acid in greening barley. *Proc Natl Acad Sci USA* **72**, 2719–2723.
- Belasco, J. G., ed. (1993).** *Control of messenger RNA stability*, 1st edn. San Diego: Acad. Press.
- Bendig, C. (2007).** Genetische Optimierung von *Bacillus megaterium* zur Proteinproduktion. Diplomarbeit. TU Braunschweig.
- Biedendieck, R. (2006).** *Bacillus megaterium*: Versatile tools for production, secretion and purification of recombinant proteins. Dissertation. TU Braunschweig.
- Biedendieck, R., Borgmeier, C., Bunk, B., Stammen, S., Scherling, C., Meinhardt, F., Wittmann, C. & Jahn, D. (2011).** Systems biology of recombinant protein production using *Bacillus megaterium*. *Meth Enzymol* **500**, 165–195.
- Biedendieck, R., Bunk, B., Furch, T., Franco-Lara, E., Jahn, M. & Jahn, D. (2010a).** Systems biology of recombinant protein production in *Bacillus megaterium*. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **120**, 133–161.
- Biedendieck, R., Gamer, M., Jaensch, L., Meyer, S., Rohde, M., Deckwer, W.-D. & Jahn, D. (2007a).** A sucrose-inducible promoter system for the intra- and extracellular protein production in *Bacillus megaterium*. *J Biotechnol* **132**, 426–430.
- Biedendieck, R., Malten, M., Barg, H., Bunk, B., Martens, J.-H., Deery, E., Leech, H., Warren, M. J. & Jahn, D. (2010b).** Metabolic engineering of cobalamin (vitamin B₁₂) production in *Bacillus megaterium*. *Microb Biotechnol* **3**, 24–37.
- Biedendieck, R., Yang, Y., Deckwer, W.-D., Malten, M. & Jahn, D. (2007b).** Plasmid system for the intracellular production and purification of affinity-tagged proteins in *Bacillus megaterium*. *Biotechnol Bioeng* **96**, 525–537.
- Bogorad, L. & Granick, S. (1953).** The enzymatic synthesis of porphyrins from porphobilinogen. *Proc Natl Acad Sci USA* **39**, 1176–1188.
- Bradford, M. M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248–254.
- Brinkmann, U., Mattes, R. E. & Buckel, P. (1989).** High-level expression of recombinant genes in *Escherichia coli* is dependent on the availability of the *dnaY* gene product. *Gene* **85**, 109–114.
- Brockmeier, U., Caspers, M., Freudl, R., Jockwer, A., Noll, T. & Eggert, T. (2006).** Systematic screening of all signal peptides from *Bacillus subtilis*: a powerful strategy in optimizing heterologous protein secretion in Gram-positive bacteria. *J Mol Biol* **362**, 393–402.
- Burgess-Brown, N. A., Sharma, S., Sobott, F., Loenarz, C., Oppermann, U. & Gileadi, O. (2008).** Codon optimization can improve expression of human genes in *Escherichia coli*: A multi-gene study. *Protein Expr Purif* **59**, 94–102.
- Burton, G., Fagerness, P. E., Hosozawa, S., Jordan, P. M. & Scott, A. I. (1979).** ¹³C NMR evidence for a new intermediate, pre-uroporphyrinogen, in the enzymic transformation of porphobilinogen into uroporphyrinogens I and III. *J Chem Soc, Chem Commun*, 202.

- Calderone, T. L., Stevens, R. D. & Oas, T. G. (1996).** High-level misincorporation of lysine for arginine at AGA codons in a fusion protein expressed in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **262**, 407–412.
- Carstens, C.-P., Bonnardel, J., Allen, R. & Waesche, A. (2001).** BL21-Codon-Plus cells correct expression problems caused by codon bias. *Strategies*, 50–51.
- Chang, C. K. (1994).** Haem d₁ and other haem cofactors from bacteria. *Ciba Found Symp* **180**, 228–38; discussion 238–46.
- Charette, M. & Gray, M. W. (2000).** Pseudouridine in RNA: What, where, how, and why. *IUBMB Life* **49**, 341–351.
- Chelikani, P., Fita, I. & Loewen, P. C. (2004).** Diversity of structures and properties among catalases. *Cell Mol Life Sci* **61**, 192–208.
- Cortazzo, P., Cervenansky, C., Marin, M., Reiss, C., Ehrlich, R. & Deana, A. (2002).** Silent mutations affect *in vivo* protein folding in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* **293**, 537–541.
- Crick, F. H. (1966).** Codon-anticodon pairing: The wobble hypothesis. *J Mol Biol* **19**, 548–555.
- Crockett, N., Alefounder, P. R., Battersby, A. R. & Abell, C. (1991).** Uroporphyrinogen III synthase: Studies on its mechanism of action, molecular biology and biochemistry. *Tetrahedron* **47**, 6003–6014.
- Dailey, H. A., ed. (1990).** *Biosynthesis of heme and chlorophylls*. New York, N.Y.: McGraw-Hill.
- Dailey, H. A., Dailey, T. A., Wu, C. K., Medlock, A. E., Wang, K. F., Rose, J. P. & Wang, B. C. (2000).** Ferrochelatase at the millennium: Structures, mechanisms and 2Fe-2S clusters. *Cell Mol Life Sci* **57**, 1909–1926.
- Davies, R. C. & Neuberger, A. (1973).** Polypyrroles formed from porphobilinogen and amines by uroporphyrinogen synthetase of *Rhodospseudomonas spheroides*. *Biochem J* **133**, 471–492.
- de Bary, A. (1884).** *Vergleichende Morphologie und Biologie der Pilze Mycetozen und Bacterien*. Leipzig: Wilhelm Engelmann.
- Deckwer, W. D., Müller, R. J., Van den Heuvel, J. & Kleeberg, I. (2001).** Enzyme which cleaves ester groups and which is derived from *Thermomonospora fusca*. GBF patent W001123581A1.
- deHaseth, P. L., Zupancic, M. L. & Record, M. T. (1998).** RNA polymerase-promoter interactions: the comings and goings of RNA polymerase. *J Bacteriol* **180**, 3019–3025.
- Del Tito, B. J., Ward, J. M., Hodgson, J., Gershater, C. J., Edwards, H., Wysocki, L. A., Watson, F. A., Sathe, G. & Kane, J. F. (1995).** Effects of a minor isoleucyl tRNA on heterologous protein translation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **177**, 7086–7091.
- dos Reis, M., Wernisch, L. & Savva, R. (2003).** Unexpected correlations between gene expression and codon usage bias from microarray data for the whole *Escherichia coli* K-12 genome. *Nucleic Acids Res* **31**, 6976–6985.
- Elena, C., Ravasi, P., Castelli, M. E., Peirú, S. & Menzella, H. G. (2014).** Expression of codon optimized genes in microbial systems: Current industrial applications and perspectives. *Front Microbiol* **5**.
- Elf, J., Nilsson, D., Tenson, T. & Ehrenberg, M. (2003).** Selective charging of tRNA isoacceptors explains patterns of codon usage. *Science* **300**, 1718–1722.
- Eppinger, M., Bunk, B., Johns, M. A., Edirisinghe, J. N., Kutumbaka, K. K., Koenig, S. S. K., Creasy, H. H., Rosovitz, M. J., Riley, D. R., Daugherty, S., Martin, M., Elbourne, L. D. H., Paulsen, I., Biedendieck, R., Braun, C., Grayburn, S., Dhingra, S., Lukyanchuk, V., Ball, B., Ul-Qamar, R., Seibel, J., Bremer, E., Jahn, D., Ravel, J. & Vary, P. S. (2011).** Genome sequences of the biotechnologically important *Bacillus megaterium* strains QM B1551 and DSM319. *J Bacteriol* **193**, 4199–4213.
- Ferreira, G. C., Andrew, T. L., Karr, S. W. & Dailey, H. A. (1988).** Organization of the terminal two enzymes of the heme biosynthetic pathway. Orientation of protoporphyrinogen oxidase and evidence for a membrane complex. *J Biol Chem* **263**, 3835–3839.

- Ferreira, G. C. & Gong, J. (1995).** 5-Aminolevulinate synthase and the first step of heme biosynthesis. *J Bioenerg Biomembr* **27**, 151–159.
- Fields, S. & Song, O. (1989).** A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**, 245–246.
- Foerster, H. F. & Foster, J. W. (1966).** Response of *Bacillus* spores to combinations of germinative compounds. *J Bacteriol* **91**, 1168–1177.
- Fortian, A., Castano, D., Gonzalez, E., Lain, A., Falcon-Perez, J. M. & Millet, O. (2011).** Structural, thermodynamic, and mechanistical studies in uroporphyrinogen III synthase: Molecular basis of congenital erythropoietic porphyria. *Adv Protein Chem Struct Biol* **83**, 43–74.
- Frankenberg, N., Moser, J. & Jahn, D. (2003).** Bacterial heme biosynthesis and its biotechnological application. *Appl Microbiol Biotechnol* **63**, 115–127.
- Fu, W., Lin, J. & Cen, P. (2007).** 5-Aminolevulinate production with recombinant *Escherichia coli* using a rare codon optimizer host strain. *Appl Microbiol Biotechnol* **75**, 777–782.
- Fuglsang, A. (2003).** Codon optimizer: A freeware tool for codon optimization. *Protein Expr Purif* **31**, 247–249.
- Fürch, T., Wittmann, C., Wang, W., Franco-Lara, E., Jahn, D. & Deckwer, W.-D. (2007).** Effect of different carbon sources on central metabolic fluxes and the recombinant production of a hydrolase from *Thermobifida fusca* in *Bacillus megaterium*. *J Biotechnol* **132**, 385–394.
- Gally, D. L., Hancock, I. C., Harwood, C. R. & Archibald, A. R. (1991).** Cell wall assembly in *Bacillus megaterium*: incorporation of new peptidoglycan by a monomer addition process. *J Bacteriol* **173**, 2548–2555.
- Gamer, M. (2009).** Directed development of *Bacillus megaterium* for applications in recombinant protein production. Dissertation. TU Braunschweig.
- Gamer, M., Frode, D., Biedendieck, R., Stammen, S. & Jahn, D. (2009).** A T7 RNA polymerase-dependent gene expression system for *Bacillus megaterium*. *Appl Microbiol Biotechnol* **82**, 1195–1203.
- Ged, C., Moreau-Gaudry, F., Richard, E., Robert-Richard, E. & Verneuil, H. de (2009).** Congenital erythropoietic porphyria: Mutation update and correlations between genotype and phenotype. *Cell Mol Biol* **55**, 53–60.
- Gibson, K. D., Laver, W. G. & Neuberger, A. (1958).** Initial stages in the biosynthesis of porphyrins. The formation of 5-aminolaevulinic acid from glycine and succinyl-coenzyme A by particles from chicken erythrocytes. *Biochem J* **70**, 71–81.
- Gill, R., Kolstoe, S. E., Mohammed, F., Al D-Bass, A., Mosely, J. E., Sarwar, M., Cooper, J. B., Wood, S. P. & Shoolingin-Jordan, P. M. (2009).** Structure of human porphobilinogen deaminase at 2.8 Å: The molecular basis of acute intermittent porphyria. *Biochem J* **420**, 17–25.
- Glaser, P., Ladant, D., Sezer, O., Pichot, F., Ullmann, A. & Danchin, A. (1988).** The calmodulin-sensitive adenylate cyclase of *Bordetella pertussis*: Cloning and expression in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **2**, 19–30.
- Gong, M., Gong, F. & Yanofsky, C. (2006).** Overexpression of *tnaC* of *Escherichia coli* inhibits growth by depleting tRNA^{Pro} availability. *J Bacteriol* **188**, 1892–1898.
- Gorrec, F. (2009).** The MORPHEUS protein crystallization screen. *J Appl Crystallogr* **42**, 1035–1042.
- Gouy, M. & Gautier, C. (1982).** Codon usage in bacteria: correlation with gene expressivity. *Nucleic Acids Res* **10**, 7055–7074.
- Grote, A., Hiller, K., Scheer, M., Munch, R., Nortemann, B., Hempel, D. C. & Jahn, D. (2005).** JCat: a novel tool to adapt codon usage of a target gene to its potential expression host. *Nucleic Acids Res* **33**, W526–31.

- Gruber, K., Puffer, B. & Kräutler, B. (2011). Vitamin B₁₂-derivatives-enzyme cofactors and ligands of proteins and nucleic acids. *Chem Soc Rev* **40**, 4346–4363.
- Guegan, R., Camadro, J.-M., Saint Girons, I. & Picardeau, M. (2003). *Leptospira* spp. possess a complete haem biosynthetic pathway and are able to use exogenous haem sources. *Mol Microbiol* **49**, 745–754.
- Gustafsson, C., Govindarajan, S. & Minshull, J. (2004). Codon bias and heterologous protein expression. *Trends Biotechnol* **22**, 346–353.
- Gustilo, E. M., Vendeix, F. A. & Agris, P. F. (2008). tRNA's modifications bring order to gene expression. *Curr Opin Microbiol* **11**, 134–140.
- Hale, R. S. & Thompson, G. (1998). Codon optimization of the gene encoding a domain from human type 1 neurofibromin protein results in a threefold improvement in expression level in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* **12**, 185–188.
- Hart, G. J., Abell, C. & Battersby, A. R. (1986). Purification, N-terminal amino acid sequence and properties of hydroxymethylbilane synthase (porphobilinogen deaminase) from *Escherichia coli*. *Biochem J* **240**, 273–276.
- Hart, G. J. & Battersby, A. R. (1985). Purification and properties of uroporphyrinogen III synthase (co-synthetase) from *Euglena gracilis*. *Biochem J* **232**, 151–160.
- Hart, G. J., Miller, A. D. & Battersby, A. R. (1988). Evidence that the pyrromethane cofactor of hydroxymethylbilane synthase (porphobilinogen deaminase) is bound through the sulphur atom of a cysteine residue. *Biochem J* **252**, 909–912.
- Harwood, C. R. & Cranenburgh, R. (2008). *Bacillus* protein secretion: an unfolding story. *Trends Microbiol* **16**, 73–79.
- Hebeda, R. E., Styrlund, C. R. & Teague, W. M. (1988). Benefits of *Bacillus megaterium* amylase in dextrose production. *Starch* **40**, 33–36.
- Heinemann, I. U., Jahn, M. & Jahn, D. (2008). The biochemistry of heme biosynthesis. *Arch Biochem Biophys* **474**, 238–251.
- Hennig, M., Grimm, B., Contestabile, R., John, R. A. & Jansonius, J. N. (1997). Crystal structure of glutamate-1-semialdehyde aminomutase: An alpha2-dimeric vitamin B₆-dependent enzyme with asymmetry in structure and active site reactivity. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 4866–4871.
- Hewlett, E. L., Urban, M. A., Manclark, C. R. & Wolff, J. (1976). Extracytoplasmic adenylate cyclase of *Bordetella pertussis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **73**, 1926–1930.
- Higgs, P. G. & Ran, W. (2008). Coevolution of codon usage and tRNA genes leads to alternative stable states of biased codon usage. *Mol Biol Evol* **25**, 2279–2291.
- Higuchi, M. & Bogorad, L. (1975). The purification and properties of uroporphyrinogen I synthases and uroporphyrinogen III cosynthase. Interactions between the enzymes. *Ann NY Acad Sci* **244**, 401–418.
- Hoffmann, F. & Rinas, U. (2004). Stress induced by recombinant protein production in *Escherichia coli*. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **89**, 73–92.
- Holley, R. W., Apgar, J., Everett, G. A., Madison, J. T., Marquisee, M., Merrill, S. H., Penswick, J. R. & Zamir, A. (1965). Structure of a ribonucleic acid. *Science* **147**, 1462–1465.
- Hou, B.-H., Takanaga, H., Grossmann, G., Chen, L.-Q., Qu, X.-Q., Jones, A. M., Lalonde, S., Schweissgut, O., Wiechert, W. & Frommer, W. B. (2011). Optical sensors for monitoring dynamic changes of intracellular metabolite levels in mammalian cells. *Nat Protoc* **6**, 1818–1833.
- Huang, X., Holden, H. M. & Raushel, F. M. (2001). Channeling of substrates and intermediates in enzyme-catalyzed reactions. *Annu Rev Biochem* **70**, 149–180.

- Ikemura, T. (1981).** Correlation between the abundance of *Escherichia coli* transfer RNAs and the occurrence of the respective codons in its protein genes: A proposal for a synonymous codon choice that is optimal for the *E. coli* translational system. *J Mol Biol* **151**, 389–409.
- Ilag, L. L. & Jahn, D. (1992).** Activity and spectroscopic properties of the *Escherichia coli* glutamate 1-semialdehyde aminotransferase and the putative active site mutant K265R. *Biochemistry* **31**, 7143–7151.
- Indiveri, C., Galluccio, M., Scalise, M. & Pochini, L. (2013).** Strategies of bacterial over expression of membrane transporters relevant in human health: The successful case of the three members of OCTN subfamily. *Mol Biotechnol* **54**, 724–736.
- Jahn, D., Hungerer, C. & Troup, B. (1996).** Ungewöhnliche Wege und umweltregulierte Gene der bakteriellen Hämbiosynthese. *Naturwissenschaften* **83**, 389–400.
- Jahn, D., Verkamp, E. & Soll, D. (1992).** Glutamyl-transfer RNA: A precursor of heme and chlorophyll biosynthesis. *Trends Biochem Sci* **17**, 215–218.
- Jones, R. M. & Jordan, P. M. (1994).** Purification and properties of porphobilinogen deaminase from *Arabidopsis thaliana*. *Biochem J* **299** (Pt 3), 895–902.
- Jordan, E., Hust, M., Roth, A., Biedendieck, R., Schirrmann, T., Jahn, D. & Dubel, S. (2007).** Production of recombinant antibody fragments in *Bacillus megaterium*. *Microb Cell Fact* **6**, 2.
- Jordan, P. M. (1991).** *Biosynthesis of tetrapyrroles*. Amsterdam, New York: Elsevier.
- Jordan, P. M. & Dailey, H. A. (1990).** Biochemistry of porphyrins. *Mol Aspects Med*, 21–37.
- Jordan, P. M. & Gibbs, P. N. (1985).** Mechanism of action of 5-aminolaevulinate dehydratase from human erythrocytes. *Biochem J* **227**, 1015–1020.
- Jordan, P. M., Mgbeje, B. I., Alwan, A. F. & Thomas, S. D. (1987).** Nucleotide sequence of *hemD*, the second gene in the hem operon of *Escherichia coli* K-12. *Nucl Acids Res* **15**, 10583.
- Jordan, P. M. & Seehra, J. S. (1979).** The biosynthesis of uroporphyrinogen III: Order of assembly of the four porphobilinogen molecules in the formation of the tetrapyrrole ring. *FEBS Lett* **104**, 364–366.
- Jordan, P. M. & Shemin, D. (1973).** Purification and properties of uroporphyrinogen I synthetase from *Rhodospseudomonas spheroides*. *J Biol Chem* **248**, 1019–1024.
- Jordan, P. M., Thomas, S. D. & Warren, M. J. (1988).** Purification, crystallization and properties of porphobilinogen deaminase from a recombinant strain of *Escherichia coli* K12. *Biochem J* **254**, 427–435.
- Jordan, P. M. & Warren, M. J. (1987).** Evidence for a dipyrromethane cofactor at the catalytic site of *E. coli* porphobilinogen deaminase. *FEBS Lett* **225**, 87–92.
- Kanaya, S., Yamada, Y., Kudo, Y. & Ikemura, T. (1999).** Studies of codon usage and tRNA genes of 18 unicellular organisms and quantification of *Bacillus subtilis* tRNAs: Gene expression level and species-specific diversity of codon usage based on multivariate analysis. *Gene* **238**, 143–155.
- Kane, J. F. (1995).** Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol* **6**, 494–500.
- Karimova, G., Pidoux, J., Ullmann, A. & Ladant, D. (1998).** A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 5752–5756.
- Karimova, G., Ullmann, A. & Ladant, D. (2000).** A bacterial two-hybrid system that exploits a cAMP signaling cascade in *Escherichia coli*. *Methods Enzymol* **328**, 59–73.
- Kaup, B., Bringer-Meyer, S. & Sahm, H. (2003).** Metabolic engineering of *Escherichia coli*: Construction of an efficient biocatalyst for D-mannitol formation in a whole-cell biotransformation. *Commun Agric Appl Biol Sci* **68**, 235–240.

- Keller-Hüschemenger, J. (2012).** Produktion und Reinigung der Porphobilinogen-Deaminase HemC und der Uroporphyrinogen III-Synthase HemD aus *B. megaterium* und Untersuchungen zu deren Komplexbildung. Masterarbeit. TU Braunschweig.
- Kikuchi, G., Kumar, A., Talimage, P. & Shemin, D. (1958).** The enzymatic synthesis of 5-aminolevulinic acid. *J Biol Chem* **233**, 1214–1219.
- Kim, S. & Lee, S. B. (2006).** Rare codon clusters at 5'-end influence heterologous expression of archaeal gene in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* **50**, 49–57.
- Kim, S. H., Suddath, F. L., Quigley, G. J., McPherson, A., Sussman, J. L., Wang, A. H., Seeman, N. C. & Rich, A. (1974).** Three-dimensional tertiary structure of yeast phenylalanine transfer RNA. *Science* **185**, 435–440.
- Kleber-Janke, T. & Becker, W. M. (2000).** Use of modified BL21(DE3) *Escherichia coli* cells for high-level expression of recombinant peanut allergens affected by poor codon usage. *Protein Expr Purif* **19**, 419–424.
- Klunkelfuß, S. (2013).** Einfluss von seltenen tRNAs auf die rekombinante Proteinproduktion in *Bacillus megaterium*. Bachelorarbeit. TU Braunschweig.
- Knuuti, T. (2015).** Natürliche Kompetenz und Proteinexport in *Bacillus megaterium* - Grundlagen und biotechnologische Anwendungen. Dissertation. TU Braunschweig.
- Koch, M., Breithaupt, C., Kiefersauer, R., Freigang, J., Huber, R. & Messerschmidt, A. (2004).** Crystal structure of protoporphyrinogen IX oxidase: A key enzyme in haem and chlorophyll biosynthesis. *EMBO J* **23**, 1720–1728.
- Kohashi, M., Clement, R. P., Tse, J. & Piper, W. N. (1984).** Rat hepatic uroporphyrinogen III co-synthase. Purification and evidence for a bound folate coenzyme participating in the biosynthesis of uroporphyrinogen III. *Biochem J* **220**, 755–765.
- Köhler, C., Mandal, D., Gaston, K. W., Grosjean, H., Limbach, P. A. & Rajbhandary, U. L. (2014).** Life without tRNA Ile-lysidine synthetase: Translation of the isoleucine codon AUA in *Bacillus subtilis* lacking the canonical tRNA^{Ile}. *Nucl Acids Res* **42**, 1904–1915.
- Komar, A. A., Lesnik, T. & Reiss, C. (1999).** Synonymous codon substitutions affect ribosome traffic and protein folding during *in vitro* translation. *FEBS Lett* **462**, 387–391.
- Korneli, C., David, F., Biedendieck, R., Jahn, D. & Wittmann, C. (2013).** Getting the big beast to work: systems biotechnology of *Bacillus megaterium* for novel high-value proteins. *J Biotechnol* **163**, 87–96.
- Kreft, J., Bernhard, K. & Goebel, W. (1978).** Recombinant plasmids capable to replication in *B. subtilis* and *E. coli*. *Mol Gen Genet* **162**, 59–67.
- Kudla, G., Murray, A. W., Tollervey, D. & Plotkin, J. B. (2009).** Coding-sequence determinants of gene expression in *Escherichia coli*. *Science* **324**, 255–258.
- Ladant, D., Michelson, S., Sarfati, R., Gilles, A. M., Predeleanu, R. & Barzu, O. (1989).** Characterization of the calmodulin-binding and of the catalytic domains of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase. *J Biol Chem* **264**, 4015–4020.
- Laemmli, U. K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685.
- Lalonde, S., Ehrhardt, D. W., Loqué, D., Chen, J., Rhee, S. Y. & Frommer, W. B. (2008).** Molecular and cellular approaches for the detection of protein-protein interactions: Latest techniques and current limitations. *Plant J* **53**, 610–635.
- Lander, M., Pitt, A. R., Alefounder, P. R., Bardy, D., Abell, C. & Battersby, A. R. (1991).** Studies on the mechanism of hydroxymethylbilane synthase concerning the role of arginine residues in substrate binding. *Biochem J* **275** (Pt 2), 447–452.

- Layer, G., Jahn, D. & Jahn, M. (2011).** 70 Heme Biosynthesis. In *Handbook of porphyrin science (Volume 15)*, pp. 159–215. Edited by K. M. Kadish, K. M. Smith & R. Guillard: World Scientific Publishing Company.
- Layer, G., Reichelt, J., Jahn, D. & Heinz, D. W. (2010).** Structure and function of enzymes in heme biosynthesis. *Protein Sci* **19**, 1137–1161.
- Layer, G., Verfurth, K., Mahlitz, E. & Jahn, D. (2002).** Oxygen-independent coproporphyrinogen-III oxidase HemN from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **277**, 34136–34142.
- Leeper, F. J. (1994).** The evidence for a spirocyclic intermediate in the formation of uroporphyrinogen III by cosynthase. *Ciba Found Symp* **180**, 111–123; discussion 124–130.
- Leupold, S. (2009).** Entwicklung einer Software zur Auswertung mikroskopischer Mehrkanal-Zeitraffer-Aufnahmen am Beispiel der Produktbildung von *Bacillus megaterium*. Diplomarbeit. TU Braunschweig.
- Li, W., Zhou, X. & Lu, P. (2004).** Bottlenecks in the expression and secretion of heterologous proteins in *Bacillus subtilis*. *Res Microbiol* **155**, 605–610.
- Li, Y., Chen, C. X., Specht, B.-U. von & Hahn, H. P. (2002).** Cloning and hemolysin-mediated secretory expression of a codon-optimized synthetic human interleukin-6 gene in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* **25**, 437–447.
- Louie, G. V. (1993).** Porphobilinogen deaminase and its structural similarity to the bidomain binding proteins. *Curr Opin Struct Biol* **3**, 401–408.
- Louie, G. V., Brownlie, P. D., Lambert, R., Cooper, J. B., Blundell, T. L., Wood, S. P., Malashkevich, V. N., Hadener, A., Warren, M. J. & Shoolingin-Jordan, P. M. (1996).** The three-dimensional structure of *Escherichia coli* porphobilinogen deaminase at 1.76-Å resolution. *Proteins* **25**, 48–78.
- Louie, G. V., Brownlie, P. D., Lambert, R., Cooper, J. B., Blundell, T. L., Wood, S. P., Warren, M. J., Woodcock, S. C. & Jordan, P. M. (1992).** Structure of porphobilinogen deaminase reveals a flexible multidomain polymerase with a single catalytic site. *Nature* **359**, 33–39.
- Lowe, T. M. & Eddy, S. R. (1997).** tRNAscan-SE: A program for improved detection of transfer RNA-genes in genomic sequence. *Nucl Acids Res* **25**, 955–964.
- Lüer, C., Schauer, S., Mobius, K., Schulze, J., Schubert, W.-D., Heinz, D. W., Jahn, D. & Moser, J. (2005).** Complex formation between glutamyl-tRNA reductase and glutamate-1-semialdehyde 2,1-aminomutase in *Escherichia coli* during the initial reactions of porphyrin biosynthesis. *J Biol Chem* **280**, 18568–18572.
- Maertens, B., Priestersbach, A., Groll, U. von, Roth, U., Kubicek, J., Gerrits, M., Graf, M., Liss, M., Daubert, D., Wagner, R. & Schäfer, F. (2010).** Gene optimization mechanisms: A multi-gene study reveals a high success rate of full-length human proteins expressed in *Escherichia coli*. *Protein Sci* **19**, 1312–1326.
- Makrides, S. C. (1996).** Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev* **60**, 512–538.
- Malten, M., Biedendieck, R., Gamer, M., Drews, A.-C., Stammen, S., Buchholz, K., Dijkhuizen, L. & Jahn, D. (2006).** A *Bacillus megaterium* plasmid system for the production, export, and one-step purification of affinity-tagged heterologous levansucrase from growth medium. *Appl Environ Microbiol* **72**, 1677–1679.
- Malten, M., Hollmann, R., Deckwer, W.-D. & Jahn, D. (2005a).** Production and secretion of recombinant *Leuconostoc mesenteroides* dextranase DsrS in *Bacillus megaterium*. *Biotechnol Bioeng* **89**, 206–218.
- Malten, M., Nahrstedt, H., Meinhardt, F. & Jahn, D. (2005b).** Coexpression of the type I signal peptidase gene *sipM* increases recombinant protein production and export in *Bacillus megaterium* MS941. *Biotechnol Bioeng* **91**, 616–621.

- Marco, A. de, Deuerling, E., Mogk, A., Tomoyasu, T. & Bukau, B. (2007).** Chaperone-based procedure to increase yields of soluble recombinant proteins produced in *E. coli*. *BMC Biotechnol* **7**, 32.
- Martens, J. H., Barg, H., Warren, M. J. & Jahn, D. (2002).** Microbial production of vitamin B₁₂. *Appl Microbiol Biotechnol* **58**, 275–285.
- Martin, L., Prieto, M. A., Cortes, E. & Garcia, J. L. (1995).** Cloning and sequencing of the *pac* gene encoding the penicillin G acylase of *Bacillus megaterium* ATCC 14945. *FEMS Microbiol Lett* **125**, 287–292.
- Masoumi, A., Heinemann, I. U., Rohde, M., Koch, M., Jahn, M. & Jahn, D. (2008).** Complex formation between protoporphyrinogen IX oxidase and ferrochelatase during haem biosynthesis in *Thermosynechococcus elongatus*. *Microbiology* **154**, 3707–3714.
- Mathews, M. A., Schubert, H. L., Whitby, F. G., Alexander, K. J., Schadick, K., Bergonia, H. A., Phillips, J. D. & Hill, C. P. (2001).** Crystal structure of human uroporphyrinogen III synthase. *EMBO J* **20**, 5832–5839.
- Mathewson, J. & Corwin, A. J. (1961).** Biosynthesis of pyrrole pigments: A mechanism for porphobilinogen polymerization. *Am Chem Comm*, 1313–1315.
- McNicholas, P. M., Javor, G., Darie, S. & Gunsalus, R. P. (1997).** Expression of the heme biosynthetic pathway genes *hemCD*, *hemH*, *hemM*, and *hemA* of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* **146**, 143–148.
- Meier, F., Suter, B., Grosjean, H., Keith, G. & Kubli, E. (1985).** Queuosine modification of the wobble base in tRNA^{His} influences 'in vivo' decoding properties. *EMBO J* **4**, 823–827.
- Michiels, J., Xi, C., Verhaert, J. & Vanderleyden, J. (2002).** The functions of Ca⁽²⁺⁾ in bacteria: A role for EF-hand proteins?. *Trends Microbiol* **10**, 87–93.
- Miles, E. W., Rhee, S. & Davies, D. R. (1999).** The molecular basis of substrate channeling. *J Biol Chem* **274**, 12193–12196.
- Moore, S. J., Lawrence, A. D., Biedendieck, R., Deery, E., Frank, S., Howard, M. J., Rigby, S. E. & Warren, M. J. (2013).** Elucidation of the anaerobic pathway for the corrin component of cobalamin (vitamin B₁₂). *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 14906–14911.
- Moore, S. J., Mayer, M. J., Biedendieck, R., Deery, E. & Warren, M. J. (2014).** Towards a cell factory for vitamin B₁₂ production in *Bacillus megaterium*: Bypassing of the cobalamin riboswitch control elements. *N Biotechnol* **31**, 553–561.
- Moser, J., Schubert, W. D., Beier, V., Bringemeier, I., Jahn, D. & Heinz, D. W. (2001).** V-shaped structure of glutamyl-tRNA reductase, the first enzyme of tRNA-dependent tetrapyrrole biosynthesis. *EMBO J* **20**, 6583–6590.
- Moszer, I., Rocha, E. P. C. & Danchin, A. (1999).** Codon usage and lateral gene transfer in *Bacillus subtilis*. *Curr Opin Microbiol* **2**, 524–528.
- Moynie, L., Schnell, R., McMahon, S. A., Sandalova, T., Boulkerou, W. A., Schmidberger, J. W., Alphey, M., Cukier, C., Duthie, F., Kopec, J., Liu, H., Jacewicz, A., Hunter, W. N., Naismith, J. H. & Schneider, G. (2013).** The AEROPATH project targeting *Pseudomonas aeruginosa*: Crystallographic studies for assessment of potential targets in early-stage drug discovery. *Acta Crystallogr F Struct Biol Cryst Commun* **69**, 25–34.
- Nagaraj, V. A., Arumugam, R., Gopalakrishnan, B., Jyothsna, Y. S., Rangarajan, P. N. & Padmanaban, G. (2008).** Unique properties of *Plasmodium falciparum* porphobilinogen deaminase. *J Biol Chem* **283**, 437–444.
- Nahrstedt, H., Wittchen, K.-D., Rachman, M. A. & Meinhardt, F. (2004).** Identification and functional characterization of a type I signal peptidase gene of *Bacillus megaterium* DSM319. *Appl Microbiol Biotechnol* **64**, 243–249.

- Nasvall, S. J., Chen, P. & Bjork, G. R. (2004).** The modified wobble nucleoside uridine-5-oxyacetic acid in tRNA^{Pro}(cmo5UGG) promotes reading of all four proline codons *in vivo*. *RNA (New York, N.Y.)* **10**, 1662–1673.
- Nogaj, L. A. & Beale, S. I. (2005).** Physical and kinetic interactions between glutamyl-tRNA reductase and glutamate-1-semialdehyde aminotransferase of *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Biol Chem* **280**, 24301–24307.
- Nomura, M. & Morgan, E. A. (1977).** Genetics of bacterial ribosomes. *Annu Rev Genet* **11**, 297–347.
- Novy, R., Drott, D., Yaeger, K. & Mierendorf, R. (2001).** Overcoming the codon bias of *E. coli* for enhanced protein expression. *inNovations* **12**, 1–3.
- Ovadi, J., Mohamend, O., Ibrahim, R. & Batke, J. (1983).** Interaction of the dissociable glycerol-3-phosphate dehydrogenase and fructose-1,6-bisphosphate aldolase. Quantitative analysis by an extrinsic fluorescence probe. *Eur J Biochem* **133**, 433–437.
- Palomares, L. A., Estrada-Mondaca, S. & Ramírez, O. T. (2004).** Production of recombinant proteins: Challenges and solutions. *Meth Mol Biol* **267**, 15–52.
- Pan, P., Woehl, E. & Dunn, M. F. (1997).** Protein architecture, dynamics and allostery in tryptophan synthase channeling. *Trends Biochem Sci* **22**, 22–27.
- Panek, H. & O'Brian, M. R. (2002).** A whole genome view of prokaryotic haem biosynthesis. *Microbiology* **148**, 2273–2282.
- Peng, S., Zhang, H., Gao, Y., Pan, X., Cao, P., Li, M. & Chang, W. (2011).** Crystal structure of uroporphyrinogen III synthase from *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Biochem Biophys Res Commun* **408**, 576–581.
- Persaud, C., Lu, Y., Vila-Sanjurjo, A., Campbell, J. L., Finley, J. & O'Connor, M. (2010).** Mutagenesis of the modified bases, m(5)U1939 and psi2504, in *Escherichia coli* 23S rRNA. *Biochem Biophys Res Commun* **392**, 223–227.
- Petrides, P. E. (1997).** Die akute intermittierende Porphyrrie. *Dtsch Arztebl International* **94**, A-3407.
- Philipp-Dormston, W. K. & Doss, M. (1973).** Comparison of porphyrin and heme biosynthesis in various heterotrophic bacteria. *Enzyme* **16**, 57–64.
- Pichon, C., Atshaves, B. P., Stolowich, N. J. & Scott, A. I. (1994a).** Evidence for an intermediate in the enzymatic formation of uroporphyrinogen III. *Bioorg Med Chem* **2**, 153–168.
- Pichon, C., Atshaves, B. P., Xue, T., Stolowich, N. J. & Scott, A. I. (1994b).** Studies on uro'gen III synthase with modified bilanes. *Bioorg Med Chem Lett* **4**, 1105–1110.
- Piston, D. W. & Kremers, G.-J. (2007).** Fluorescent protein FRET: The good, the bad and the ugly. *Trends Biochem Sci* **32**, 407–414.
- Plotkin, J. B. & Kudla, G. (2011).** Synonymous but not the same: The causes and consequences of codon bias. *Nat Rev Genet* **12**, 32–42.
- Pohl, S. & Harwood, C. R. (2010).** Heterologous protein secretion by *Bacillus* species from the cradle to the grave. *Adv Appl Microbiol* **73**, 1–25.
- Porra, R. J. & Falk, J. E. (1964).** The enzymic conversion of coproporphyrinogen 3 into protoporphyrin 9. *Biochem J* **90**, 69–75.
- Pranchevicius, M.-C. S., Oliveira, L. L., Rosa, J. C., Avanci, N. C., Quiapim, A. C., Roque-Barreira, M.-C. & Goldman, M.-H. S. (2012).** Characterization and optimization of ArtinM lectin expression in *Escherichia coli*. *BMC Biotechnol* **12**, 44.
- Priest, F. G. (1977).** Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*. *Bacteriol Rev* **41**, 711–753.
- Priest, F. G., Goodfellow, M. & Todd, C. (1988).** A numerical classification of the genus *Bacillus*. *J Gen Microbiol* **134**, 1847–1882.

- Puigbo, P., Guzman, E., Romeu, A. & Garcia-Vallve, S. (2007).** OPTIMIZER: a web server for optimizing the codon usage of DNA sequences. *Nucleic Acids Res* **35**, W126–31.
- Raina, M. & Ibba, M. (2014).** tRNAs as regulators of biological processes. *Front Genet* **5**, 171.
- Ran, W. & Higgs, P. G. (2010).** The influence of anticodon-codon interactions and modified bases on codon usage bias in bacteria. *Mol Biol Evol* **27**, 2129–2140.
- Raux, E., Lanois, A., Warren, M. J., Rambach, A. & Thermes, C. (1998).** Cobalamin (vitamin B₁₂) biosynthesis: Identification and characterization of a *Bacillus megaterium* *cobI* operon. *Biochem J* **335** (Pt 1), 159–166.
- Raux, E., Leech, H. K., Beck, R., Schubert, H. L., Santander, P. J., Roessner, C. A., Scott, A. I., Martens, J. H., Jahn, D., Thermes, C., Rambach, A. & Warren, M. J. (2003).** Identification and functional analysis of enzymes required for precorrin-2 dehydrogenation and metal ion insertion in the biosynthesis of sirohaem and cobalamin in *Bacillus megaterium*. *Biochem J* **370**, 505–516.
- Reznikoff, W. S. (1992).** The lactose operon-controlling elements: A complex paradigm. *Mol Microbiol* **6**, 2419–2422.
- Roberts, A., Gill, R., Hussey, R. J., Mikolajek, H., Erskine, P. T., Cooper, J. B., Wood, S. P., Chrystal, E. J. T. & Shoolingin-Jordan, P. M. (2013).** Insights into the mechanism of pyrrole polymerization catalysed by porphobilinogen deaminase: High-resolution X-ray studies of the *Arabidopsis thaliana* enzyme. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **69**, 471–485.
- Rodgers, K. R. (1999).** Heme-based sensors in biological systems. *Curr Opin Chem Biol* **3**, 158–167.
- Roessner, C. A., Ponnampertuma, K. & Scott, A. (2002).** Mutagenesis identifies a conserved tyrosine residue important for the activity of uroporphyrinogen III synthase from *Anacystis nidulans*. *FEBS Lett* **525**, 25–28.
- Rosano, G. L. & Ceccarelli, E. A. (2009).** Rare codon content affects the solubility of recombinant proteins in a codon bias-adjusted *Escherichia coli* strain. *Microb Cell Fact* **8**, 41.
- Rosenberg, A. H., Goldman, E., Dunn, J. J., Studier, F. W. & Zubay, G. (1993).** Effects of consecutive AGG codons on translation in *Escherichia coli*, demonstrated with a versatile codon test system. *J Bacteriol* **175**, 716–722.
- Roth, A. (2005).** Mannitolproduktion im rekombinanten *Bacillus megaterium*. Diplomarbeit. TU Braunschweig.
- Rudolph, J. & Stubbe, J. (1995).** Investigation of the mechanism of phosphoribosylamine transfer from glutamine phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase to glycylamide ribonucleotide synthetase. *Biochemistry* **34**, 2241–2250.
- Ruiz, C., Blanco, A., Pastor, F I Javier & Diaz, P. (2002).** Analysis of *Bacillus megaterium* lipolytic system and cloning of LipA, a novel subfamily I.4 bacterial lipase. *FEMS Microbiol Lett* **217**, 263–267.
- Rygus, T. & Hillen, W. (1991).** Inducible high-level expression of heterologous genes in *Bacillus megaterium* using the regulatory elements of the xylose-utilization operon. *Appl Microbiol Biotechnol* **35**, 594–599.
- Rygus, T., Scheler, A., Allmansberger, R. & Hillen, W. (1991).** Molecular cloning, structure, promoters and regulatory elements for transcription of the *Bacillus megaterium* encoded regulon for xylose utilization. *Arch Microbiol* **155**, 535–542.
- Sambrook, J. & Russel, D. (2001).** *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor NY USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schlieker, C., Bukau, B. & Mogk, A. (2002).** Prevention and reversion of protein aggregation by molecular chaperones in the *E. coli* cytosol: implications for their applicability in biotechnology. *J Biotechnol* **96**, 13–21.
- Schubert, H. L., Phillips, J. D., Heroux, A. & Hill, C. P. (2008).** Structure and mechanistic implications of a uroporphyrinogen III synthase-product complex. *Biochemistry* **47**, 8648–8655.

- Scott, A. I. (1993).** How nature synthesizes vitamin B₁₂? A survey of the last four billion years. *Angew Chem. Int Ed Engl* **32**, 1223–1243.
- Searle, B. C. (2010).** Scaffold: A bioinformatic tool for validating MS/MS-based proteomic studies. *Proteomics* **10**, 1265–1269.
- Shaner, N. C., Steinbach, P. A. & Tsien, R. Y. (2005).** A guide to choosing fluorescent proteins. *Nat Methods* **2**, 905–909.
- Sharp, P. M., Emery, L. R. & Zeng, K. (2010).** Forces that influence the evolution of codon bias. *Philos Transact Royal Society* **365**, 1203–1212.
- Sharp, P. M. & Li, W. H. (1987).** The codon adaptation index - A measure of directional synonymous codon usage bias, and its potential applications. *Nucl Acids Res* **15**, 1281–1295.
- Shemin, D. & Russell, C. S. (1953).** 5-Aminolevulinic acid, its role in the biosynthesis of porphyrins and purines. *J Am Chem Soc* **75**, 4873–4874.
- Shoolingin-Jordan, P. M. (1995).** Porphobilinogen deaminase and uroporphyrinogen III synthase: Structure, molecular biology, and mechanism. *J Bioenerg Biomembr* **27**, 181–195.
- Shoolingin-Jordan, P. M., Al-Dbass, A., McNeill, L. A., Sarwar, M. & Butler, D. (2003).** Human porphobilinogen deaminase mutations in the investigation of the mechanism of dipyrromethane cofactor assembly and tetrapyrrole formation. *Biochem Soc Trans* **31**, 731–735.
- Shoolingin-Jordan, P. M., Warren, M. J. & Awan, S. J. (1996).** Discovery that the assembly of the dipyrromethane cofactor of porphobilinogen deaminase holoenzyme proceeds initially by the reaction of preuroporphyrinogen with the apoenzyme. *Biochem J* **316** (Pt 2), 373–376.
- Song, G., Li, Y., Cheng, C., Zhao, Y., Gao, A., Zhang, R., Joachimiak, A., Shaw, N. & Liu, Z.-J. (2009).** Structural insight into acute intermittent porphyria. *FASEB J* **23**, 396–404.
- Sorensen, H. P. & Mortensen, K. K. (2005).** Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *J Biotechnol* **115**, 113–128.
- Sorensen, M. A., Kurland, C. G. & Pedersen, S. (1989).** Codon usage determines translation rate in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **207**, 365–377.
- Sorensen, M. A. & Pedersen, S. (1991).** Absolute *in vivo* translation rates of individual codons in *Escherichia coli*. The two glutamic acid codons GAA and GAG are translated with a threefold difference in rate. *J Mol Biol* **222**, 265–280.
- Spanjaard, R. A., Chen, K., Walker, J. R. & van Duin, J. (1990).** Frameshift suppression at tandem AGA and AGG codons by cloned *tRNA*-genes: Assigning a codon to *argU* tRNA and T4 tRNA^{Arg}. *Nucl Acids Res* **18**, 5031–5036.
- Spanjaard, R. A. & van Duin, J. (1988).** Translation of the sequence AGG-AGG yields 50 % ribosomal frameshift. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**, 7967–7971.
- Spivey, H. O. & Ovadi, J. (1999).** Substrate channeling. *Methods* **19**, 306–321.
- Stammen, S., Müller, B. K., Korneli, C., Biedendieck, R., Gamer, M., Franco-Lara, E. & Jahn, D. (2010a).** High-yield intra- and extracellular protein production using *Bacillus megaterium*. *Appl Environ Microbiol* **76**, 4037–4046.
- Stammen, S., Schuller, F., Dietrich, S., Gamer, M., Biedendieck, R. & Jahn, D. (2010b).** Application of *Escherichia coli* phage K1E DNA-dependent RNA polymerase for *in vitro* RNA synthesis and *in vivo* protein production in *Bacillus megaterium*. *Applied microbiology and biotechnology* **88**, 529–539.
- Stark, W. M., Hart, G. J. & Battersby, A. R. (1986).** Synthetic studies on the proposed spiro intermediate for biosynthesis of the natural porphyrins: Inhibition of cosynthetase. *J Chem Soc, Chem Commun*, 465.
- Suwandhi, L. (2012).** Untersuchungen zur Protein-Protein Interaktion zwischen HemC und HemD aus *Bacillus megaterium*. Bachelorarbeit. TU Braunschweig.

- Tan, F.-C., Cheng, Q., Saha, K., Heinemann, I. U., Jahn, M., Jahn, D. & Smith, A. G. (2008).** Identification and characterization of the *Arabidopsis* gene encoding the tetrapyrrole biosynthesis enzyme uroporphyrinogen III synthase. *Biochem J* **410**, 291–299.
- Tanigawa, K., Takamura, N. & Yamashita, S. (1995).** Congenital erythropoietic porphyria. *Nihon Rinsho* **53**, 1422–1426.
- Tegel, H., Tourle, S., Ottosson, J. & Persson, A. (2010).** Increased levels of recombinant human proteins with the *Escherichia coli* strain Rosetta(DE3). *Protein Expr Purif* **69**, 159–167.
- Terpe, K. (2006).** Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: From molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl Microbiol Biotechnol* **72**, 211–222.
- Thauer, R. K. & Bonacker, L. G. (1994).** Biosynthesis of coenzyme F₄₃₀, a nickel porphinoid involved in methanogenesis. *Ciba Found Symp* **180**, 210–222; discussion 222–227.
- Tjalsma, H., Antelmann, H., Jongbloed, J. D., Braun, P. G., Darmon, E., Dorenbos, R., Dubois, J.-Y. F., Westers, H., Zanen, G., Quax, W. J., Kuipers, O. P., Bron, S., Hecker, M. & van Dijl, J. M. (2004).** Proteomics of protein secretion by *Bacillus subtilis*: separating the "secrets" of the secretome. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**, 207–233.
- Tsai, S. F., Bishop, D. F. & Desnick, R. J. (1987).** Purification and properties of uroporphyrinogen III synthase from human erythrocytes. *J Biol Chem* **262**, 1268–1273.
- Tuller, T., Waldman, Y. Y., Kupiec, M. & Ruppin, E. (2010).** Translation efficiency is determined by both codon bias and folding energy. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**, 3645–3650.
- Valdez-Cruz, N. A., Ramirez, O. T. & Trujillo-Roldan, M. A. (2011).** Molecular responses of *Escherichia coli* caused by heat stress and recombinant protein production during temperature induction. *Bioeng Bugs* **2**, 105–110.
- van Dijl, J. M., Jong, A. de, Smith, H., Bron, S. & Venema, G. (1991).** Signal peptidase I overproduction results in increased efficiencies of export and maturation of hybrid secretory proteins in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* **227**, 40–48.
- Vary, P. S. (1994).** Prime time for *Bacillus megaterium*. *Microbiology* **140**, 1001–1013.
- Vary, P. S., Biedendieck, R., Fuerch, T., Meinhardt, F., Rohde, M., Deckwer, W.-D. & Jahn, D. (2007).** *Bacillus megaterium* - From simple soil bacterium to industrial protein production host. *Appl Microbiol Biotechnol* **76**, 957–967.
- Vavilin, D. V. & Vermaas, W. J. (2002).** Regulation of the tetrapyrrole biosynthetic pathway leading to heme and chlorophyll in plants and cyanobacteria. *Physiol Plant* **115**, 9–24.
- Veening, J.-W., Smits, W. K., Hamoen, L. W., Jongbloed, J. D. H. & Kuipers, O. P. (2004).** Visualization of differential gene expression by improved cyan fluorescent protein and yellow fluorescent protein production in *Bacillus subtilis*. *Appl Environ Microbiol* **70**, 6809–6815.
- Villalobos, A., Ness, J. E., Gustafsson, C., Minshull, J. & Govindarajan, S. (2006).** Gene Designer: A synthetic biology tool for constructing artificial DNA segments. *BMC Bioinformatics* **7**, 285.
- Von Tersch, M. A. & Robbins, H. L. (1990).** Efficient cloning in *Bacillus megaterium*: Comparison to *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* cloning hosts. *FEMS Microbiol Lett* **58**, 305–309.
- Waegeman, H. & Soetaert, W. (2011).** Increasing recombinant protein production in *Escherichia coli* through metabolic and genetic engineering. *J Ind Microbiol Biotechnol* **38**, 1891–1910.
- Wahab, S. Z., Rowley, K. O. & Holmes, W. M. (1993).** Effects of tRNA(1Leu) overproduction in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **7**, 253–263.
- Wang, W., Hollmann, R., Furch, T., Nimtz, M., Malten, M., Jahn, D. & Deckwer, W.-D. (2005).** Proteome analysis of a recombinant *Bacillus megaterium* strain during heterologous production of a glucosyltransferase. *Proteome Sci* **3**, 4.

- Warren, M. J. & Jordan, P. M. (1988).** Investigation into the nature of substrate binding to the dipyrromethane cofactor of *Escherichia coli* porphobilinogen deaminase. *Biochemistry* **27**, 9020–9030.
- Weinstein, J. D. & Beale, S. I. (1983).** Separate physiological roles and subcellular compartments for two tetrapyrrole biosynthetic pathways in *Euglena gracilis*. *J Biol Chem* **258**, 6799–6807.
- Welch, M., Govindarajan, S., Ness, J. E., Villalobos, A., Gurney, A., Minshull, J., Gustafsson, C. & Kudla, G. (2009).** Design parameters to control synthetic gene expression in *Escherichia coli*. *PLoS One* **4**, e7002.
- Welch, M., Villalobos, A., Gustafsson, C. & Minshull, J. (2011).** Designing genes for successful protein expression. *Meth Enzymol* **498**, 43–66.
- Williams, D. C., Morgan, G. S., McDonald, E. & Battersby, A. R. (1981).** Purification of porphobilinogen deaminase from *Euglena gracilis* and studies of its kinetics. *Biochem J* **193**, 301–310.
- Williams, D. P., Regier, D., Akiyoshi, D., Genbauffe, F. & Murphy, J. R. (1988).** Design, synthesis and expression of a human interleukin-2 gene incorporating the codon usage bias found in highly expressed *Escherichia coli* genes. *Nucleic Acids Res* **16**, 10453–10467.
- Wittchen, K. D. & Meinhardt, F. (1995).** Inactivation of the major extracellular protease from *Bacillus megaterium* DSM319 by gene replacement. *Appl Microbiol Biotechnol* **42**, 871–877.
- Wong, S. L. (1995).** Advances in the use of *Bacillus subtilis* for the expression and secretion of heterologous proteins. *Curr Opin Biotechnol* **6**, 517–522.
- Wood, S., Lambert, R. & Jordan, P. M. (1995).** Molecular basis of acute intermittent porphyria. *Mol Med Today* **1**, 232–239.
- Woodcock, S. C. & Jordan, P. M. (1994).** Evidence for participation of aspartate-84 as a catalytic group at the active site of porphobilinogen deaminase obtained by site-directed mutagenesis of the *hemC* gene from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **33**, 2688–2695.
- Yang, Y., Malten, M., Grote, A., Jahn, D. & Deckwer, W.-D. (2007).** Codon optimized *Thermobifida fusca* hydrolase secreted by *Bacillus megaterium*. *Biotechnol Bioeng* **96**, 780–794.
- Yuan, G. & Wong, S. L. (1995).** Isolation and characterization of *Bacillus subtilis* *groE* regulatory mutants: evidence for *orf39* in the *dnaK* operon as a repressor gene in regulating the expression of both *groE* and *dnaK*. *J Bacteriol* **177**, 6462–6468.

9 Anhang

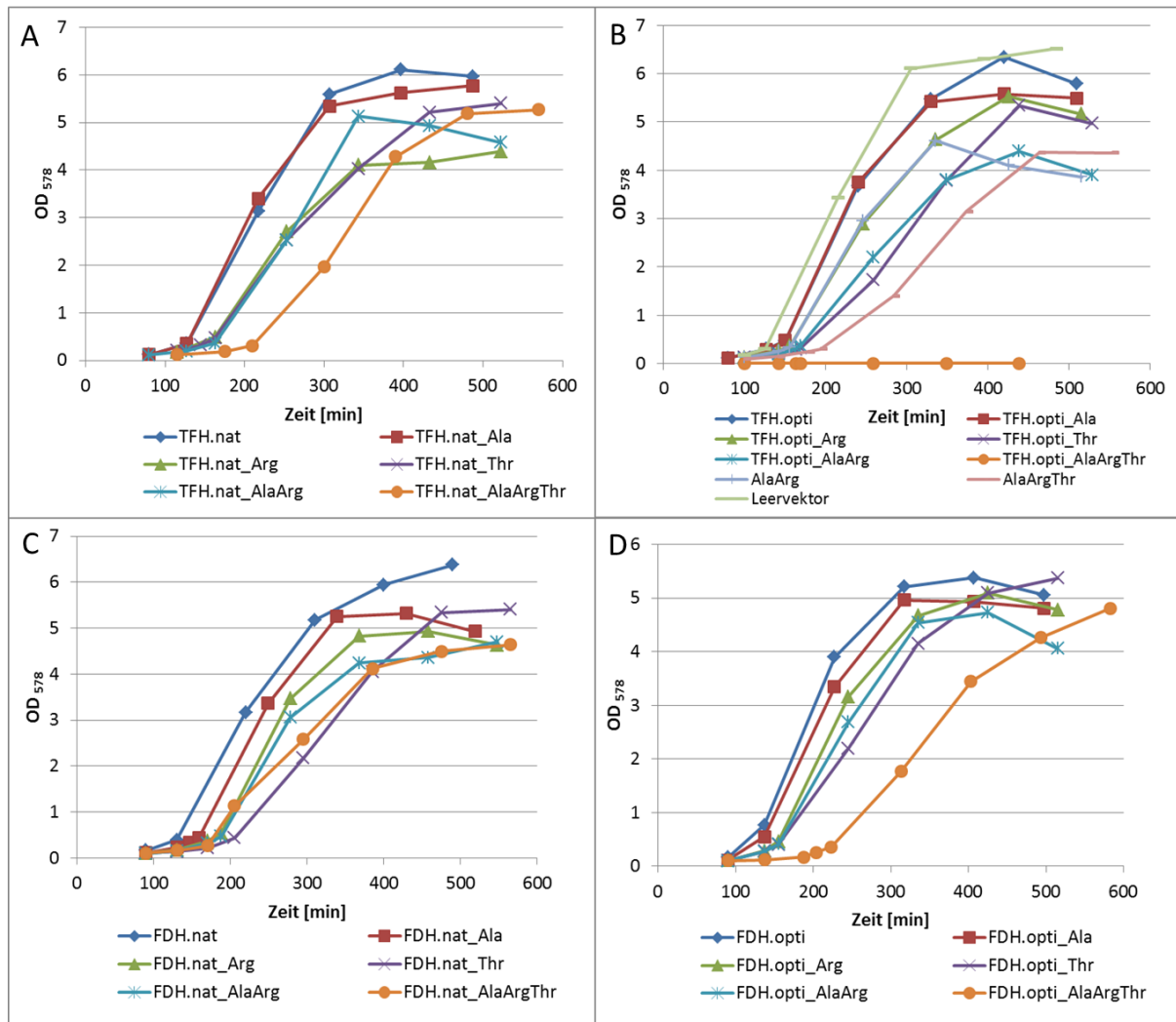


Abb. 37: Einfluss der *tRNA* Coexpression auf das Wachstum der Testprotein-produzierenden *B. megaterium* Stämme. Die *B. megaterium* Stämme wurden in Tet-LB-Flüssigmedium bei 37°C kultiviert. In 1,5 h Abständen wurde die optische Dichte der Kulturen bei 578 nm bestimmt. Bei einer OD₅₇₈ von 0,4 erfolgte die Induktion der Testgenexpression. Die Wachstumskurven wurden exemplarisch aus den Werten eines Versuches dargestellt. A: Wachstum verschiedener *B. megaterium* Stämme, die *tfh.nat* zusammen mit verschiedenen *tRNAs* exprimieren. B: Wachstum verschiedener *B. megaterium* Stämme, die *tfh.opti* zusammen mit verschiedenen *tRNAs* exprimieren bzw. die nur *tRNAs* exprimieren bzw. eines Stammes, der weder ein Testprotein noch zusätzliche *tRNAs* produziert (mit Leervektor). C: Wachstum verschiedener *B. megaterium* Stämme, die *fdh.nat* zusammen mit verschiedenen *tRNAs* exprimieren. D: Wachstum verschiedener *B. megaterium* Stämme, die *tfh.opti* zusammen mit verschiedenen *tRNAs* exprimieren.

Tab. 20: Proteine, die nur in *B. megaterium* MS941 transformiert mit pFDH.opti identifiziert wurden (Gr.1). Grau unterlegt: ribosomale Proteine.

Short Name	Name	Factor	TIGR roles
BMD_0133	30S ribosomal protein S10	-	Protein synthesis
BMD_0124	50S ribosomal protein L7/L12	-	Protein synthesis
BMD_0121	50S ribosomal protein L11	-	Protein synthesis
BMD_0143	30S ribosomal protein S17	-	Protein synthesis
BMD_0260	10 kDa chaperonin	-	Protein fate
BMD_0145	50S ribosomal protein L24	-	Protein synthesis

Short Name	Name	Factor	TIGR roles
BMD_0150	50S ribosomal protein L18	-	Protein synthesis
BMD_4201	30S ribosomal protein S16	-	Protein synthesis
BMD_5255	30S ribosomal protein S18	-	Protein synthesis
BMD_0139	50S ribosomal protein L22	-	Protein synthesis
BMD_1902	putative peptidoglycan binding domain protein	-	Cell envelope
BMD_2231	organic hydroperoxide resistance protein	-	Cellular processes
BMD_1604	cyanophycinase domain protein	-	Energy metabolism
BMD_0144	50S ribosomal protein L14	-	Protein synthesis
BMD_3065	DinB family protein	-	Unknown function
BMD_0152	50S ribosomal protein L30	-	Protein synthesis
BMD_1542	Hut operon positive regulatory protein	-	Regulatory functions
BMD_1771	urocanate hydratase HutU	-	Energy metabolism
BMD_5252	50S ribosomal protein L9	-	Protein synthesis
BMD_4439	arginine repressor	-	Amino acid biosynthesis
BMD_4857	DNA-protecting protein	-	Cellular processes
BMD_5162	sporulation initiation phosphotransferase F	-	Cellular processes
BMD_4558	30S ribosomal protein S20	-	Protein synthesis
BMD_5257	30S ribosomal protein S6	-	Protein synthesis
BMD_1571	phosphotransferase system (PTS)	-	Transport and binding proteins
BMD_4298	menaquinol-cytochrome c reductase	-	Energy metabolism
BMD_0470	conserved hypothetical protein	-	Hypothetical proteins
BMD_0570	conserved hypothetical protein	-	Hypothetical proteins
BMD_0577	conserved hypothetical protein	-	Hypothetical proteins
BMD_3892	gamma-glutamyltransferase	-	Biosynthesis of cofactors, prosthetic groups, and carriers
BMD_2698	cold shock protein	-	Cellular processes
BMD_4103	stage V sporulation protein S	-	Cellular processes
BMD_4715	thioredoxin	-	Energy metabolism
BMD_0047	conserved hypothetical protein	-	Hypothetical proteins
BMD_0722	oligoendopeptidase F	-	Protein fate
BMD_0271	phosphoribosylaminoimidazole carboxylase	-	Purines, pyrimidines, nucleosides, and nucleotides
BMD_5045	HPr-like protein Crh	-	Signal transduction
BMD_0706	oligopeptide ABC transporter	-	Transport and binding proteins
BMD_3022	CBS domain pair protein	-	Unknown function
BMD_4545	GatB/Yqey domain protein	-	Unknown function
BMD_5149	protein-tyrosine phosphatase	-	Unknown function
BMD_1279	6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase	-	Biosynthesis of cofactors, prosthetic groups, and carriers
BMD_1874	acetoin dehydrogenase E2 component	-	Energy metabolism
BMD_4806	conserved hypothetical protein	-	Hypothetical proteins
BMD_2156	probable transcription regulator sinR,	-	Regulatory functions
BMD_4136	ribosome-binding factor A	-	Transcription
BMD_1307	protein of unknown function	-	Unknown function
BMD_3319	putative hydrolase	-	Unknown function
BMD_1373	aspartate 1-decarboxylase	-	Biosynthesis of cofactors, prosthetic groups, and carriers
BMD_0225	serine/threonine-protein kinase RsbT	-	Cellular processes

Short Name	Name	Factor	TIGR roles
BMD_1315	thiol-disulfide isomerase	-	Cellular processes
BMD_1873	acetoin dehydrogenase E1 component	-	Energy metabolism
BMD_3665	ethanolamine ammonia-lyase	-	Energy metabolism
BMD_0190	conserved hypothetical protein	-	Hypothetical proteins
BMD_2177	conserved hypothetical protein	-	Hypothetical proteins
BMD_2575	conserved hypothetical protein	-	Hypothetical proteins
BMD_3843	transcriptional regulator, MerR family	-	Regulatory functions
BMD_0701	oligopeptide ABC transporter	-	Transport and binding proteins
BMD_0986	Amidohydrolase	-	Unknown function
BMD_2414	nitroreductase family protein	-	Unknown function
BMD_4446	protein of unknown function	-	Unknown function

Tab. 21: Proteine, die nur in *B. megaterium* MS941 transformiert mit pFDH.opti_AlaArg identifiziert wurden (Gr.2).

Short Name	Name	Factor	TIGR roles
BMD_3852	sucrose-6-phosphate hydrolase	-	Unknown function
BMD_4654	rod shape-determining protein MreC	-	Cell envelope
BMD_1367	conserved hypothetical protein	-	Hypothetical proteins
BMD_5063	HPr(Ser) kinase/phosphatase	-	Regulatory functions
BMD_0403	A/G-specific adenine glycosylase	-	DNA metabolism
BMD_4429	phosphate butyryltransferase	-	Energy metabolism
BMD_2722	conserved hypothetical protein	-	Hypothetical proteins
BMD_4233	conserved hypothetical protein	-	Hypothetical proteins
BMD_3190	thiol-disulfide oxidoreductase BdbD	-	Protein fate
BMD_0763	ATP-dependent RNA helicase	-	Transcription
BMD_0162	cobalt import ABC transporter, ATP-binding protein CbiQ 1	-	Transport and binding proteins
BMD_1961	cobalamin synthesis protein/ P47K family protein	-	Unknown function
BMD_2379	rhodanese domain protein	-	Unknown function
BMD_5114	flotillin-like protein	-	Unknown function

Tab. 22: Proteine, die in *B. megaterium* MS941 transformiert mit pFDH.opti im Vergleich zu MS941 transformiert mit pFDH.opti_AlaArg hochreguliert sind (Gr.3). Grau unterlegt: ribosomale Proteine.

Short Name	Name	Factor	TIGR roles
BMD_4647	50S ribosomal protein L21	49,29	Protein synthesis
BMD_0161	50S ribosomal protein L17	38,87	Protein synthesis
BMD_0158	30S ribosomal protein S13	33,18	Protein synthesis
BMD_0521	conserved hypothetical protein	29,10	Hypothetical proteins
BMD_0159	30S ribosomal protein S11	25,60	Protein synthesis
BMD_2278	immune inhibitor A metalloprotease	18,96	Protein fate
BMD_0136	50S ribosomal protein L23	18,01	Protein synthesis
BMD_4367	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	17,06	Protein fate
BMD_4645	50S ribosomal protein L27	15,17	Protein synthesis
BMD_0153	50S ribosomal protein L15	14,22	Protein synthesis
BMD_0148	30S ribosomal protein S8	13,75	Protein synthesis

Short Name	Name	Factor	TIGR roles
BMD_0167	30S ribosomal protein S9	11,06	Protein synthesis
BMD_2165	protease	10,43	Protein fate
BMD_2648	conserved hypothetical protein	9,75	Hypothetical proteins
BMD_0166	50S ribosomal protein L13	9,64	Protein synthesis
BMD_4196	50S ribosomal protein L19	8,77	Protein synthesis
BMD_0142	50S ribosomal protein L29	8,53	Protein synthesis
BMD_4990	acyl-CoA dehydrogenase	7,58	Fatty acid and phospholipid metabolism
BMD_2617	conserved hypothetical protein	6,64	Hypothetical proteins
BMD_1857	xylose repressor	6,26	Regulatory functions
BMD_3807	cold shock protein	5,69	Cellular processes
BMD_4275	propionyl-CoA carboxylase	5,69	Fatty acid and phospholipid metabolism
BMD_0151	30S ribosomal protein S5	5,47	Protein synthesis
BMD_4063	4-aminobutyrate transaminase	5,12	Central intermediary metabolism
BMD_4736	50S ribosomal protein L20	4,88	Protein synthesis
BMD_3356	acetyltransferase, GNAT family	4,74	Unknown function
BMD_0129	30S ribosomal protein S12	4,62	Protein synthesis
BMD_0130	30S ribosomal protein S7	4,51	Protein synthesis
BMD_0228	serine-protein kinase RsbW	3,79	Cellular processes
BMD_2737	alpha-galactosidase	3,79	Energy metabolism
BMD_0817	O-acetylhomoserine sulfhydrylase	3,32	Amino acid biosynthesis
BMD_1404	cold shock protein	3,13	Cellular processes
BMD_2059	hypothetical protein	2,84	hypothetical protein
BMD_2465	Allophanate hydrolase subunit 2	2,84	Unknown function
BMD_1595	2,5-diketo-D-gluconic acid reductase A	2,53	Biosynthesis of cofactors, prosthetic groups, and carriers
BMD_1770	histidine ammonia-lyase	2,53	Energy metabolism
BMD_1278	GTP cyclohydrolase II	2,37	Biosynthesis of cofactors, prosthetic groups, and carriers
BMD_3813	putative 1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase	2,37	Energy metabolism
BMD_4798	acetyl-coenzyme A synthetase	2,37	Energy metabolism
BMD_2173	ABC transporter, ATP-binding protein	2,37	Transport and binding proteins
BMD_4061	succinate-semialdehyde dehydrogenase	2,37	Unknown function
BMD_1976	oxidoreductase	2,21	Unknown function
BMD_5226	catalase	2,13	Cellular processes
BMD_4674	conserved hypothetical protein	2,13	Hypothetical proteins
BMD_4786	ATP-NAD kinase	2,09	Biosynthesis of cofactors, prosthetic groups, and carriers
BMD_4278	acetyltransferase, GNAT family	2,09	Unknown function
BMD_4746	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	2,05	Energy metabolism

Tab. 23: Proteine, die in *B. megaterium* MS941 transformiert mit pFDH.opti_AlaArg im Vergleich zu MS941 transformiert mit pFDH.opti hochreguliert sind (Gr.4). Grau unterlegt: Proteine, die an der Pyrimidin/Purin Biosynthese beteiligt sind und Proteine, die an tRNA/rRNA Modifikation beteiligt sind.

Short Name	Name	Factor	TIGR roles
BMD_4543	conserved hypothetical protein	13,71	Hypothetical proteins
BMD_4663	valyl-tRNA synthetase	7,38	Protein synthesis
BMD_4872	ribonucleoside-diphosphate reductase	7,38	Purines, pyrimidines, nucleosides, and nucleotides

Short Name	Name	Factor	TIGR roles
BMD_1067	modifier protein of major autolysin LytC	6,86	Unknown function
BMD_0089	cell division protease FtsH	6,33	Cellular processes
BMD_0281	bifunctional purine biosynthesis protein PurH	6,33	Purines, pyrimidines, nucleosides, and nucleotides
BMD_4109	hypothetical protein	5,80	hypothetical protein
BMD_1098	flagellin	5,70	Cell envelope
BMD_4962	homoserine dehydrogenase	5,27	Amino acid biosynthesis
BMD_2683	tellurite resistance protein, putative	5,27	Cellular processes
BMD_0006	DNA gyrase, A subunit	5,27	DNA metabolism
BMD_0064	pur operon repressor	5,27	Purines, pyrimidines, nucleosides, and nucleotides
BMD_1920	transcriptional regulator	5,27	Regulatory functions
BMD_2681	Oxidoreductase family protein	5,27	Unknown function
BMD_0361	putative efflux ABC transporter, ATP-binding protein	4,75	Transport and binding proteins
BMD_4105	conserved hypothetical protein	4,75	Unknown function
BMD_4267	UDP-N-acetylmuramoylalanyl-D-glutamate--2,6-diaminopimelate ligase	4,22	Cell envelope
BMD_2161	putative nicotinate phosphoribosyltransferase	4,22	Biosynthesis of cofactors, prosthetic groups, and carriers
BMD_5054	phosphoribosylformimino-5-aminoimidazole carboxamide ribotide isomerase	4,22	Amino acid biosynthesis
BMD_0223	positive regulator of sigma-B activity	4,22	Cellular processes
BMD_4088	aluminium resistance protein	4,22	Cellular processes
BMD_4444	exodeoxyribonuclease VII, large subunit	4,22	DNA metabolism
BMD_0754	gluconate kinase	4,22	Energy metabolism
BMD_4282	conserved hypothetical protein	4,22	Hypothetical proteins
BMD_0296	23S rRNA (uracil-5-)-methyltransferase RumA	4,22	Protein synthesis
BMD_4354	two-component response regulator ResD	4,22	Signal transduction
BMD_0543	putative quinone oxidoreductase, YhdH/YhfP family	4,22	Unknown function
BMD_1546	aldehyde dehydrogenase (NAD) Family Protein	4,22	Unknown function
BMD_4934	putative aspartate aminotransferase	4,22	Unknown function
BMD_2887	aminopeptidase pepS	3,69	Protein fate
BMD_5108	two-component response regulator DegU	3,69	Signal transduction
BMD_1421	putative RNA methylase protein family	3,69	Unknown function
BMD_4963	glyoxylate reductase	3,69	Unknown function
BMD_5158	transcription termination factor Rho	3,17	Transcription
BMD_1124	putative tyrosine-protein kinase capB	3,17	Unknown function
BMD_4626	queuine tRNA-ribosyltransferase	3,17	Protein synthesis
BMD_1657	histidinol dehydrogenase	3,17	Amino acid biosynthesis
BMD_4534	GTP-binding protein Era	3,17	Cellular processes
BMD_0696	3-oxoacyl-(acyl-carrier-protein) synthase III	3,17	Fatty acid and phospholipid metabolism
BMD_0389	23S rRNA (uracil-5-)-methyltransferase RumA	3,17	Protein synthesis
BMD_2815	pyrimidine-nucleoside phosphorylase	3,17	Purines, pyrimidines, nucleosides, and nucleotides
BMD_5048	ATP-binding protein	3,17	Unknown function
BMD_4202	signal recognition particle protein	2,64	Protein fate
BMD_0282	phosphoribosylamine--glycine ligase	2,64	Purines, pyrimidines, nucleosides, and nucleotides
BMD_1431	Carboxypeptidase Taq (M32) metallopeptidase	2,64	Protein fate
BMD_5084	preprotein translocase, SecA subunit	2,64	Protein fate

Short Name	Name	Factor	TIGR roles
BMD_0288	ATP-dependent DNA helicase PcrA	2,64	DNA metabolism
BMD_0253	metalloendopeptidase, putative	2,64	Protein fate
BMD_0278	amidophosphoribosyltransferase	2,64	Purines, pyrimidines, nucleosides, and nucleotides
BMD_2878	haloacid dehalogenase-like hydrolase	2,64	Unknown function
BMD_4304	histidinol-phosphate aminotransferase	2,53	Amino acid biosynthesis
BMD_4077	LexA repressor	2,53	DNA metabolism
BMD_0214	UDP-N-acetylmuramoyl-tripeptide-D-alanyl-D-alanine ligase	2,46	Unknown function
BMD_4643	Spo0B-associated GTP binding protein Obg	2,43	Protein synthesis
BMD_1432	xanthine phosphoribosyltransferase	2,37	Purines, pyrimidines, nucleosides, and nucleotides
BMD_4239	dihydroorotate dehydrogenase	2,32	Purines, pyrimidines, nucleosides, and nucleotides
BMD_2731	malate:quinone-oxidoreductase	2,30	Energy metabolism
BMD_1858	xylose isomerase	2,29	Energy metabolism
BMD_1122	UDP-glucose 6-dehydrogenase	2,29	Unknown function
BMD_5258	GTP-binding protein EngD	2,24	Unknown function
BMD_0215	ATP-dependent RNA helicase	2,11	Transcription
BMD_0017	seryl-tRNA synthetase	2,11	Amino acid biosynthesis
BMD_1340	GTPase	2,11	Cellular processes
BMD_2814	deoxyribose-phosphate aldolase	2,11	Purines, pyrimidines, nucleosides, and nucleotides
BMD_1625	endopeptidase LytF (cell wall hydrolase)	2,11	Protein fate
BMD_0255	putative Redox-sensing transcriptional repressor rex	2,11	Transcription
BMD_4263	UDP-N-acetylenolpyruvoylglucosamine reductase	2,11	Cell envelope
BMD_2930	NAD dependent epimerase/dehydratase family	2,11	Energy metabolism
BMD_4023	D-amino acid aminotransferase	2,11	Energy metabolism
BMD_4571	GTP-binding protein	2,11	Unknown function
BMD_4587	isochorismatase family protein	2,11	Unknown function
BMD_0602	ferrochelatase	2,11	Biosynthesis of cofactors, prosthetic groups, and carriers
BMD_1957	ATP:cob(I)alamin adenosyltransferase	2,11	Biosynthesis of cofactors, prosthetic groups, and carriers
BMD_2599	precorrin-4 C11-methyltransferase	2,11	Biosynthesis of cofactors, prosthetic groups, and carriers
BMD_4723	DNA mismatch repair protein MutS	2,11	DNA metabolism
BMD_4632	conserved hypothetical protein	2,11	Hypothetical proteins
BMD_4204	signal recognition particle-docking protein FtsY	2,11	Protein fate
BMD_4829	RNA pseudouridylate synthase	2,11	Protein synthesis
BMD_4243	aspartate carbamoyltransferase	2,11	Purines, pyrimidines, nucleosides, and nucleotides
BMD_0198	mannitol dehydrogenase domain protein	2,11	Unknown function
BMD_2706	Acetyl-CoA hydrolase/transferase family protein	2,11	Unknown function
BMD_4412	carboxyl transferase	2,11	Unknown function
BMD_4779	acetate kinase	2,06	Energy metabolism

Danksagung

Ich danke Herrn **Prof. Dr. Dieter Jahn**, dass ich diese spannenden und vielseitigen Themen in seiner Arbeitsgruppe bearbeiten durfte, für seine wegweisenden Ratschläge, Motivation und die exzellenten Bedingungen im Institut.

Besonders möchte ich mich bei Frau **Prof. Dr. Gunhild Layer** nicht nur für die Übernahme des Koreferats, sondern auch für ihr Interesse an meinem Projekt, ihre Unterstützung und die hilfreiche Diskussionen bedanken.

Zudem danke ich Herrn **Prof. Dr. Stefan Dübel** für die freundliche Übernahme des Vorsitzes der Prüfungskommission.

Mein größter Dank gilt Frau **Dr. Rebekka Biedendieck** für eine hervorragende Betreuung, für ihre fachliche und persönliche Unterstützung, hilfreiche Ideen, dafür, dass sie immer ein offenes Ohr hatte und mir fortwährend mit Rat und Tat zur Seite stand und nicht zu vergessen: für die vielen leckeren Waffeln ☺.

Herzlichster Dank gebührt meinen Laborkollegen **Sarah Wienecke** und **Dr. Tobias Knuuti**. Ohne euch wären die letzten Jahre nur halb so schön gewesen! Ich danke euch für fachliche Diskussionen, aber auch das ein oder andere Schwätzchen, für eure Hilfsbereitschaft, Unterstützung, Motivation, unsere Gemeinschaft, den Spaß und die gute Zeit, die wir zusammen hatten!

Auch möchte ich mich bei **Jens Keller-Hüschemenger**, bei meinen Bachelorstudentinnen **Lisa Suwandhi** und **Saskia Klunkelfuß**, die ihre Projekte mit viel Elan und Ausdauer verfolgten und bei allen **Laborpraktikanten** (Sarah, Cathi, Irina, Anna und Simon) bedanken. Ich habe die gute Zusammenarbeit nicht nur in praktischer Hinsicht, sondern auch in persönlicher als sehr bereichernd empfunden.

Großer Dank geht außerdem an meine Kooperationspartner: **Sabine Buchmeier** für die schöne Zusammenarbeit. Deine Antikörper sind spitze! **Dr. Martin Kucklick** für die gesamte Proteomanalyse. Vielen Dank! **Dr. Peer Lukat** für die Kristall-Kooperation, seine Anregungen und Hilfsbereitschaft und **Dr. Boyke Bunk** für die Identifikation der *tRNA*-Gene.

Weiterhin gilt mein Dank der **AG Layer** sowie **Dr. Johnny** und den **Mosermädels** für die Freitagseminare, in denen ich viele Anregungen bekam.

Zudem gibt es viele Personen, die mich während der gesamten Zeit auf verschiedenste Art unterstützt haben und denen ich an dieser Stelle dafür danken möchte: **Dr. Andreas Gietl** für die vielen hilfreichen Diskussionen und seine Unterstützung beim FRET-Projekt. Ich sage nur: „Fretchen under investigation!“ **Dr. Tristan Nicke** für seine Tipps bzgl. Protein-Protein Interaktionen und seiner und **Julia Adamczyks** Hilfe bei den Äktaläufen, außerdem **Dr. Wiebke Arendt** für unzählige Ratschläge und ihre Hilfsbereitschaft, **Dr. Andrea Wesche-Franke** für ihre umfassende Unterstützung, **Simone Virus** für fachliche Tipps und nette Unterhaltungen. **Antonia Lakowitz** und **Johannes Gädke** für interessante Labmeetings und leckeren Kuchen. **Karin Münch** für die Einführung in RNA-Extraktion und qRT-PCR, **Dr. Elli Härtig** für ihre Diskussionsbereitschaft und Ratschläge, **Dr. André Frenzel** für die Antikörperreinigung, **Dr. Aaron Nuss** für die GFP-Antikörper, **Dr. Joop van den Heuvel** für die ITC-Aktion, den „**Steinerts**“ für kurzweilige Kaffeeraumaufenthalte, **Julia Hoppe** für Antikörpergaben und Einweisung in die W-Blot Doku, **Dr. Can Ünal** für interessante Diskussionen, **Kristin Haufschildt** für ihr Interesse und **Dr. Melanie Kühner** für die Schwabenconnection. Großer Dank außerdem an **Christiane Lange** und **Svenja Kiesel** für diverse Diskussionen und auch nette Stunden außerhalb des Labors, sowie **Dr. Katja Walter** meiner WG-Dis-schreib-und-Päusle-mach-u.v.m.-Partnerin und **Rebekka Bürkle**, die mir immer zur Seite steht.

An den regen Austausch bei den Doktorandenstammtische und den Spaß, den wir bei einigen Festivitäten (Halloween/80er/Fasching ect.) hatten, werde ich mich immer gerne zurückerinnern! Vielen Dank an die **Doktorandenvertreter** und **jeden einzelnen von euch!**

Allen **Mitarbeitern des Instituts für Mikrobiologie** sei von Herzen für eine freundliche Atmosphäre und die stete Hilfsbereitschaft gedankt. Insbesondere auch **Christina Nitzsche**, **Daniela Schnobel** und **Herrn Hoppe** sowie **Barbara Cwiklinski** und **Dagmar Rose**.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen **Eltern** und **Yannick**, die mich jederzeit unterstützt haben, mir gerade in aufreibenden Phasen großen Rückhalt boten und mich aufmunternd und kraftgebend begleiten.